

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



PERFIL INFLAMATÓRIO NA DOENÇA CORONÁRIA

Ana Sofia Rodrigues de Sousa e Andrade

MESTRADO EM BIOLOGIA HUMANA E AMBIENTE

2010

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



## PERFIL INFLAMATÓRIO NA DOENÇA CORONÁRIA

Ana Sofia Rodrigues de Sousa e Andrade

MESTRADO EM BIOLOGIA HUMANA E AMBIENTE

Dissertação orientada pela Doutora Teresa Pinheiro e pela  
Professora Doutora Maria Filomena Caeiro

2010

O conteúdo desta tese de mestrado é da inteira responsabilidade da autora

*Ana Sofia Rodrigues de Sousa e Andrade*

## Agradecimentos

---

Esta tese foi escrita após um ano de muito stress, muitas dúvidas, muitas interrogações. O meu percurso universitário não foi de todo fácil mas aqui está a prova que consigo terminar aquilo a que me proponho.

Todo este percurso não seria possível sem a presença e a ajuda de muitas pessoas!

Antes de mais quero agradecer às minhas colegas de licenciatura e mestrado, Joana Costa, Catarina Dourado e “Mary Maria” que me aturaram e deram força mesmo antes do mestrado. Sem elas não teria superado os meus medos, o stress e tudo o que me impedia de seguir em frente. Um grande obrigada às três!

Quero agradecer à minha colega e amiga desde o primeiro dia de faculdade, Inês Palmela, que embora não tenha estado presente em todo este percurso (separamo-nos a meio), também me ajudou por saber ouvir e por estar presente sempre que necessitava. Obrigada também à Mariana Reynaud pelas palavras amigas e pelo apoio que me deu em alturas menos boas! Vivemos longe, mas mesmo assim o apoio chegava até mim... Obrigada às duas pelos jantarinhos de apoio e não só!

É difícil encontrar palavras para agradecer aos meus pais e ao meu mano. Eu sei que não sou fácil de aturar, nada mesmo. Obrigada por estarem ao meu lado nos dias bons, nos dias maus e nos dias muito maus, por aturarem as minhas maluquices, o meu STRESS e tudo o que daí advém! Muito obrigada por acreditarem em mim e não me deixarem desistir.

Obrigada também à restante família que sempre acreditou em mim e que sempre me deu força. Um muito obrigada e um beijinho especial para o avô Ciro da “Doutora em Biologia”.

Obrigada à minha amiga de longa data, Joana Hampton e ao Bruno Matos pelo apoio e pelos momentos de lazer que também ajudam e que fazem tão bem à minha saúde mental. Sem eles estaria bem mais maluca...Muito Obrigada mesmo!

Quero agradecer também à Eva Carmo pelos cafezinhos, por me ouvir, pelo apoio em todos os aspectos! Muito Obrigada!

Quero agradecer à minha coordenadora Doutora Teresa Pinheiro. Obrigada por toda a orientação dada ao longo deste ano!

Obrigada à minha coordenadora interna, a Professora Doutora Maria Filomena Caeiro por ter aceite esta coordenação, pela sua colaboração e ajuda em tudo o que necessitei.

Obrigada Sérgio, por me aturares e por dividires comigo a amostragem e o trabalho laboratorial. Sem a tua ajuda e companhia teria sido muito mais complicado. Neste campo não posso deixar de agradecer à Patrícia Napoleão pela ajuda na amostragem e no laboratório. Obrigada também Patrícia, pelos conselhos e pelas boas práticas laboratoriais que me ensinaste.

Não posso deixar de agradecer também à equipa do Serviço de Cardiologia do Hospital de Santa Marta, que sem eles não teríamos amostras e consequentemente não teria sido possível escrever a minha tese. Obrigada ao Dr. Rui Ferreira, ao Professor Dr. Miguel Mota Carmo, à Enfermeira Mafalda Selas e à Enfermeira Cláudia Freixo.

Obrigada também à Sandra e à Rita do Laboratório de Ensaios Tecnológicos em Áreas Limpas (LETAL), que foram impecáveis comigo e por me deixar utilizar a mini centrífuga e o espectrofotómetro. Obrigada também a todos os trabalhadores da Física no ITN pela boa disposição e a todos os membros do GEB.

**Muito Obrigada a todos! Aos que referi e aos que me esqueci de referir!**

## Abreviaturas

---

<b>APC</b>	Aloficocianina (do inglês: <i>Allophycocyanin</i> )
<b>AVC</b>	Acidente vascular cerebral
<b>bmp</b>	Batimentos Por Minuto
<b>BNP</b>	Péptido natriurético do tipo B (do inglês: <i>B-type Natriuretic Peptide</i> )
<b>BSA</b>	Albumina de soro bovino (do inglês: <i>Bovine Serum Albumin</i> )
<b>CAD</b>	Doença coronária (do inglês: <i>Coronary Artery Disease</i> )
<b>CMNs</b>	Células mononucleares
<b>CRP</b>	Proteína C reactiva (do inglês: <i>C-Reactive Protein</i> )
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	Água Bidestilada
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>EAM</b>	Enfarte Agudo do Miocárdio
<b>EDTA</b>	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético (do inglês: <i>Ethylenediamine Tetraacetic Acid</i> )
<b>E-selectin</b>	Selectina Endotelial
<b>FITC</b>	Fluoresceína Isocianato (do inglês: <i>Fluorescein Isothiocyanate</i> )
<b>HDL</b>	Lipoproteínas de Alta Densidade (do inglês: <i>High Density Lipoproteins</i> )
<b>HEPES</b>	Tampão com Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)1-piperazinil]-etanosulfónico
<b>IFN</b>	Interferão
<b>IL</b>	Interleucinas
<b>LDL</b>	Lipoproteínas de Baixa Densidade (do inglês: <i>Low Density Lipoproteins</i> )
<b>M-CSF</b>	Factor Estimulador de Colónias de Macrófagos (do inglês: <i>Macrophage Colony-Stimulating Factor</i> )
<b>MMP</b>	Metaloproteinase de Matriz
<b>NF-κB</b>	Factor Nuclear kappa B (do inglês: <i>Nuclear Factor kappa B</i> )
<b>NP-40</b>	Tergitol-tipo NP-40, tampão com nonyl phenoxy polyethoxyethanol

<b>NO</b>	Óxido Nítrico (do inglês: <i>Nitric Oxide</i> )
<b>NK</b>	(do inglês: <i>natural killer</i> )
<b>ox-LDL</b>	Lipoproteínas de Baixa Densidade Oxidadas (do inglês: <i>Oxidized Low Density Lipoproteins</i> )
<b>PAT</b>	Tonometria arterial periférica (do inglês: <i>Peripheral Arterial Tonometry</i> )
<b>PBS</b>	Tampão Fostato Salino (do inglês: <i>Phosphate Buffered Saline</i> )
<b>PDGF</b>	Factor de Crescimento Derivado de Plaquetas (do inglês: <i>Platelet Derived Growth Factor</i> )
<b>PE</b>	Ficoeritrina (do inglês: <i>Phycoerythrin</i> )
<b>PercP</b>	(Do inglês: <i>Peridinin-chlorophyll-protein complex</i> )
<b>PFA</b>	Paraformaldeído
<b>PVDF</b>	(Do inglês: <i>Polyvinylidene Fluoride</i> )
<b>ROS</b>	Espécies Reactivas de Oxigénio (do inglês: <i>Reactive Oxygen Species</i> )
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato de Sódio
<b>SDS-PAGE</b>	Electroforese em Gel de Poliacrilamida e Dodecilsulfato de Sódio (do inglês: <i>Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i> )
<b>SMCs</b>	Células do Músculo Liso (do inglês: <i>Smooth Muscle Cells</i> )
<b>TGF<math>\beta</math></b>	Factor de Crescimento Tumoral Beta (do inglês: <i>Tumour Growth Factor b</i> )
<b>TMB</b>	3,3', 5,5'-Tetrametilbenzidina
<b>TNF</b>	Factor de Necrose Tumoral (do inglês: <i>Tumor Necrosis Factor</i> )
<b>V-CAM 1</b>	Molécula de Adesão Vascular 1 (do inglês: <i>Vascular Cell Adhesion Molecule 1</i> )
<b>PAI-1</b>	Inibidor do Activador do Plasminogénio 1 (Do inglês: <i>Plasminogen Activator Inhibitor-1</i> )
<b>P-selectin</b>	Selectina Endotelial e Plaquetária

## Sumário

---

Ao longo das últimas décadas o conhecimento na área das doenças cardiovasculares tem vindo a aumentar e hoje assume-se que a aterosclerose, não resulta apenas de uma acumulação de lípidos na parede arterial, mas também de um processo inflamatório complexo. A acumulação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) na parede arterial e a sua oxidação, desencadeia uma série de mecanismos inflamatórios em que estão envolvidas células do músculo liso, endoteliais e imunitárias. As LDL oxidadas (ox-LDL) promovem a activação macrofágica e de linfócitos no ateroma, perpetuando o estímulo inflamatório e conduzindo à actividade da placa e sua instabilidade. Vários estudos demonstraram associações entre os níveis de ox-LDL no plasma e a doença coronária e verificou-se uma relação entre os níveis de ox-LDL no plasma e o número de linfócitos T (estudos *in vivo*). Estudos recentes demonstraram a activação do factor de transcrição nuclear kappa B (NF-κB), responsável pela activação de muitos genes pró-inflamatórios, em diversos tipos celulares presentes nas lesões ateroscleróticas. Verificou-se também que os níveis de activação são dependentes dos níveis de ox-LDL, em monócitos (*in vitro*). No entanto, ainda se encontra por esclarecer a significância do envolvimento da via de transcrição do NF-κB nos síndromes coronários e em particular da sua relevância na activação das células mononucleadas do sangue periférico (CMNs).

Neste trabalho foram constituídos dois grupos, um com indivíduos com doença coronária confirmada e outro com indivíduos saudáveis, o grupo controlo. Foram estudadas as populações linfocitárias (CD4 e CD8) e a activação linfocitária (CD69) por citometria de fluxo, a concentração de ox-LDL no plasma por ELISA e avaliou-se a expressão do NF-κB através de *Western Blotting* em extractos totais, citoplasmáticos e nucleares de CMNs. Verificou-se que há um decréscimo do ratio CD4/CD8 no grupo de doentes relativamente aos indivíduos controlo, que poderá estar relacionado com a fase aguda da doença, que os marcadores de inflamação, função cardíaca e ventricular estão mais elevados nos doentes do que no grupo controlo e que há uma relação entre a medicação com antihipercolesterémicos e as ox-LDL. Os dados sugerem uma influência benéfica deste tipo de medicação nos níveis de ox-LDL. O principal objectivo deste trabalho era o de estudar a relação entre os níveis de ox-LDL no plasma e a activação da via de transcrição do NF-κB nas células mononucleadas do sangue periférico (CMNs), no entanto, devido às limitações de tempo e de material de estudo, as metodologias não foram devidamente optimizadas de forma a que tivesse sido possível validar os resultados obtidos.

Este trabalho permitiu verificar alguns resultados já descritos na literatura e iniciar o estabelecimento de uma metodologia de separação de CMNs e do seu fraccionamento, bem como optimizar a tecnologia de *Western Blotting* para a detecção do factor de transcrição NF-κB, o que permitirá avaliar sua relevância nas doenças cardiovasculares

Palavras chave: Aterosclerose, CMNs, NF-κB, ox-LDL, linfócitos



## Abstract

---

Atherosclerosis and its cardiovascular consequences are the major cause of death and morbidity in the world both in men and women. The accumulation of lipids in the arterial wall was assumed to be the major cause for the disease progression. In the last decades, as the knowledge evolved, this concept has been modified to a complex inflammatory process.

The accumulation of low density lipoproteins (LDL) in the arterial wall and posterior oxidation triggers a series of inflammatory mechanisms where the smooth muscle cells, endothelial cells and immunity cells are present. The oxidized low density lipoproteins (ox-LDL) promote the activation of macrophages and lymphocytes in the atheromatous plaque perpetuating the inflammatory stimuli leading to the plaque activity and instability. Recent studies demonstrated the activation of nuclear transcription factor kappa B (NF- $\kappa$ B), which is responsible for the activation of multiple pro-inflammatory genes, in different types of cells present in the atherosclerotic lesion. However, the relevance of NF- $\kappa$ B pathway in coronary syndromes and in the activation of the peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) are issues lacking clarification.

In this study two groups were constituted: a group of individuals with confirmed coronary artery disease and a group with healthy subjects, the control group. The lymphocyte populations (CD4 and CD8) and lymphocyte activation (CD69) were studied by flow cytometry. The concentration of ox-LDL in plasma was assessed by ELISA, and the expression of NF- $\kappa$ B in PBMCs cellular extracts was evaluated by Western blotting. It was found that there was a decrease in the CD4/CD8 ratio in the group of patients compared with the control subjects, which may be related to the acute phase of the disease. Markers of inflammation, cardiac and ventricular functions were higher in patients than in controls. A relationship between cholesterol lowering medication and ox-LDL was found suggesting a beneficial effect of this medication in the levels of ox-LDL. The main goal of this work was to study the relationship between the levels of ox-LDL in plasma and the activation of the NF- $\kappa$ B in PBMCs. However, due to time constraints and limitations of the study, the methodologies were not properly optimized and consequently, it was not possible to obtain consistent results.

This work confirmed some results that were already described in the literature and allowed us to establish the beginning of a methodology for the separation and fractioning of PBMCs, as well as for Western blotting in order to detect the transcription factor NF- $\kappa$ B, to address its relevance in cardiovascular diseases.

**Key words:** Atherosclerosis, PBMCs, NF- $\kappa$ B, ox-LDL, lymphocytes

# Índice

---

Sumário

*Abstract*

## 1. Introdução

1.1. Aterosclerose	1,2,3,4
1.1.1. Lipoproteínas de baixa densidade oxidadas (ox-LDL)	4,5
1.1.2. Perfil celular na aterosclerose	5,6
1.2. O factor de transcrição nuclear kappa B como mediador da resposta inflamatória	7,8,9
1.2.1. NF-κB na aterosclerose	9,10
1.3. Importância da via de transcrição do NF-κB e da ox-LDL na doença coronária	10,11

## 2. Objectivos

12

## 3. Materiais e Metodologia

3.1. Grupos de Estudo	13
3.1.1. Caracterização dos grupos de estudo	13,14
3.2. Metodologia	
3.2.1. Recolha de amostras de sangue dos doentes e do grupo controlo	14
3.2.2. Separação das células mononucleadas do sangue periférico	14,15
3.2.3. Separação das fracções nucleares e citoplasmáticas	15,16
3.2.4. Detecção e avaliação da expressão de NF-κB	
3.2.4.1. Quantificação da proteína nos extractos celulares pelo método de Lowry	16,17
3.2.4.2. <i>Western Blotting</i>	17
3.2.5. Identificação das populações de leucócitos por citometria de fluxo	18,19
3.2.6. Quantificação das ox-LDL por ELISA	19,20
3.2.7. Análise Estatística	20

## 4. Resultados

4.1. Análise e caracterização dos grupos em estudo	21,22,23
4.2. Lipoproteínas de baixa densidade oxidadas (ox-LDL)	23,24
4.3. Linfócitos	24,25
4.4. ox-LDL e linfócitos	25
4.5. Factor Nuclear kappa B	
4.5.1. Quantificação da proteína	26,27
4.5.2. Optimização do método <i>Western Blotting</i>	28,29
4.5.2.1. Armazenamento da amostra após separação das CMNs	29,30
4.5.2.2. Separação de fracções celulares: perda, degradação e contaminação de extractos	31,32
4.5.3. Ox-LDL e NF-κB	33

## 5. Discussão

34-37

## 6. Conclusões Finais e Perspectivas Futuras

38

## 7. Referências Bibliográficas

39-43

## **ANEXOS**

ANEXO I - SOLUÇÕES E REAGENTES

ANEXO II – MÉTODOS

ANEXO III- FIGURAS E TABELAS SUPLEMENTARES

## Índice de figuras

---

<b>Figura 1.</b> Processo aterosclerótico, estria gorda.	2
<b>Figura 2.</b> Processo aterosclerótico, placa fibrosa.	3
<b>Figura 3.</b> Processo aterosclerótico, ruptura e formação do trombo.	4
<b>Figura 4.</b> Diagrama esquemático da activação do NF- $\kappa$ B.	7
<b>Figura 5.</b> Esquema do protocolo de " Separação das células mononucleadas do sangue periférico".	15
<b>Figura 6.</b> Esquema do protocolo de "Separação das fracções citoplasmáticas e nucleares".	16
<b>Figura 7.</b> Representação gráfica da identificação da população de linfócitos; (A) <i>Dot Plot</i> definido em <i>Side Scatter</i> (SSC), <i>Forward scatter</i> (FSC) representativo da população de linfócitos; (B) <i>Dot Plot</i> representativo do gate da população de linfócitos CD45 <sup>+</sup> , definida dentro da população de linfócitos.	19
<b>Figura 8.</b> Teste A: Expressão da $\alpha$ -tubulina (A) e do NF- $\kappa$ B (B) em extractos citoplasmáticos e nucleares de CMNs; Expressão avaliada por <i>Western Blotting</i> , exposição de 15 segundos, seguida de revelação de 1 minuto.	30
<b>Figura 9.</b> Teste B: Expressão da $\alpha$ -tubulina (A) e do NF- $\kappa$ B (B) em extractos totais e em extractos citoplasmáticos e nucleares; Expressão avaliada por <i>Western Blotting</i> , exposição de 30 segundos, seguida de revelação de 1 minuto. As membranas foram incubadas <i>overnight</i> com o anticorpo para a subunidade p65 do NF- $\kappa$ B e as da $\alpha$ -tubulina de acordo com o protocolo	31
<b>Figura 10.</b> Teste C: Expressão da $\alpha$ -tubulina (A) e do NF- $\kappa$ B (B) em extractos citoplasmáticos e nucleares de CMNs; Expressão avaliada por <i>Western Blotting</i> , exposição de 30 segundos, seguida de revelação de 1 minuto. As membranas foram incubadas <i>overnight</i> com o anticorpo para a subunidade p65 do NF- $\kappa$ B e as da $\alpha$ -tubulina de acordo com o protocolo.	32

## Índice de tabelas

---

<b>Tabela 1.</b> Volumes de amostra utilizados em cada <i>western</i> realizado (A, B e C).	17
<b>Tabela 2.</b> Combinação de fluorocromos e anticorpos para a análise de populações de linfócitos e de monócitos por citometria de fluxo.	18
<b>Tabela 3.</b> Caracterização dos grupos de estudo_ CTR e PAT.	22
<b>Tabela 4.</b> Perfil Biológico e Bioquímico dos grupos de estudo _CTR e PAT.	23
<b>Tabela 5.</b> Concentrações de ox-LDL nos grupos CTR e PAT.	23
<b>Tabela 6 .</b> Dados de citometria dos linfócitos T de ambos os grupos em estudo.	25
<b>Tabela 7.</b> Quantificação de proteína dos extractos citoplasmáticos, nucleares e totais.	26
<b>Tabela 8.</b> Comparação entre as quantidades de proteína presentes em extractos citoplasmáticos, nucleares e totais, para cada uma das amostras, e relativamente ao mesmo número de CMNs.	27
<b>Tabela 9.</b> Listagem das amostras utilizadas nos <i>Western blots</i> A, B e C	29

## Índice de gráficos

---

**Gráfico 1.** Concentração de ox-LDL nos indivíduos com e sem dislipidemia do grupo CTR e no grupo PAT. 24

**Gráfico 2.** Relação entre os linfócitos CD3 e CD69 no grupo CTR. O ajuste linear foi significativo ( $CD69 (\%) = 86.7 - 0.77 \times CD3 (\%)$ ;  $r = -0.325$ ;  $p = 0.03$ ) e está representado pela linha a vermelho. Linhas a tracejado - bandas de confiança a 95%. 25

# 1. Introdução

---

## 1.1. Aterosclerose

A aterosclerose é a maior causa de doenças cardiovasculares e estas, uma das maiores causas de morte nos dias de hoje, representando um significativo problema de saúde a nível mundial<sup>1</sup>. A aterosclerose, é uma doença que afecta as artérias de calibre pequeno e médio, caracterizada pelo desenvolvimento de uma lesão na parede arterial, o ateroma, provocando o estreitamento do lúmen arterial e o comprometimento do fluxo sanguíneo.

Na formação e desenvolvimento do ateroma intervêm processos inflamatórios, imunitários e oxidativos<sup>1, 2</sup>. A lesão aterosclerótica é um espessamento que se desenvolve na camada íntima da parede da artéria<sup>2</sup>. É caracterizada por uma acumulação de lípidos e lipoproteínas de baixa densidade (que transportam colesterol e triglicéridos) sem a adequada remoção de colesterol por lipoproteínas de alta densidade, inflamação, morte celular e fibrose. É constituída por resíduos celulares, cálcio, elementos do tecido conjuntivo, células macrofágicas, leucócitos, células espumosas e do músculo liso<sup>2, 3</sup>.

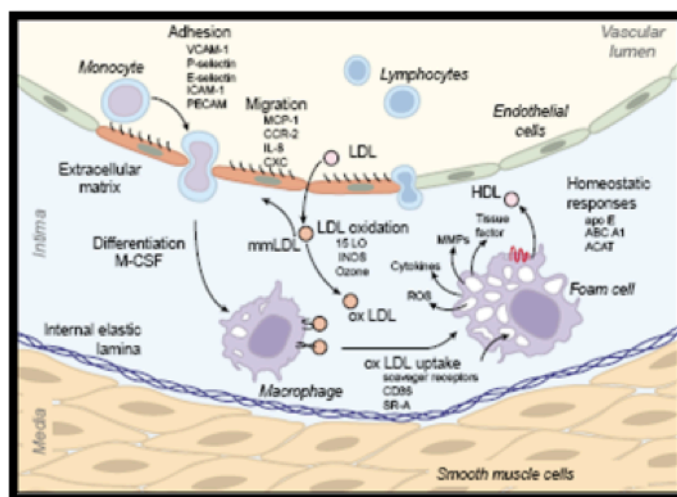
O desenvolvimento da placa aterosclerótica é compensado pela distensão da parede arterial. Por esta razão, a aterosclerose pode manter-se assintomática durante muito tempo, até que uma ruptura da placa aterosclerótica ocorra com a subsequente formação de trombo e oclusão total ou parcial do lúmen arterial levando à morte dos tecidos a jusante. Quando a ruptura da placa ocorre numa das artérias coronárias que irrigam o coração, origina o enfarte do miocárdio, que é frequentemente fatal.

Factores de risco como, a hipercolesterémia, a hipertensão, o tabagismo, a diabetes, a obesidade, assim como infecções por microorganismos (*Chlamydia pneumonia*), contribuem para o desenvolvimento do ateroma<sup>1, 4</sup>. Também o aumento da produção de espécies reactivas de oxigénio (ROS), que contribui para o aumento do stress oxidativo, é considerado um mecanismo importante na progressão da lesão. O aumento da produção de ROS é associado a muitos dos factores de risco, como a diabetes, hipercolesterémia, hipertensão e hábitos tabágicos<sup>5, 6</sup> assim como a diminuição dos mecanismos enzimáticos da sua remoção dos tecidos, como por exemplo o decréscimo da actividade da glutathione peroxidase induzida pelo fumo do tabaco<sup>7</sup>.

Na fase inicial de formação da lesão, observam-se zonas de acumulação de constituintes lipídicos designados por estrias gordas. Estas lesões tem características inflamatórias originadas pela acumulação de leucócitos (macrófagos e linfócitos T) sendo, no entanto, lesões primárias reversíveis e não sintomáticas. A evolução destas estrias gordas pode contudo, originar o ateroma<sup>2, 4</sup>.

A continuada acumulação de lípidos, em particular de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) compromete a função do endotélio arterial modelando a sua permeabilidade. O endotélio arterial é responsável pela regulação de múltiplos processos, como a adesão celular, secreção de moléculas reguladoras do tónus vascular como o óxido

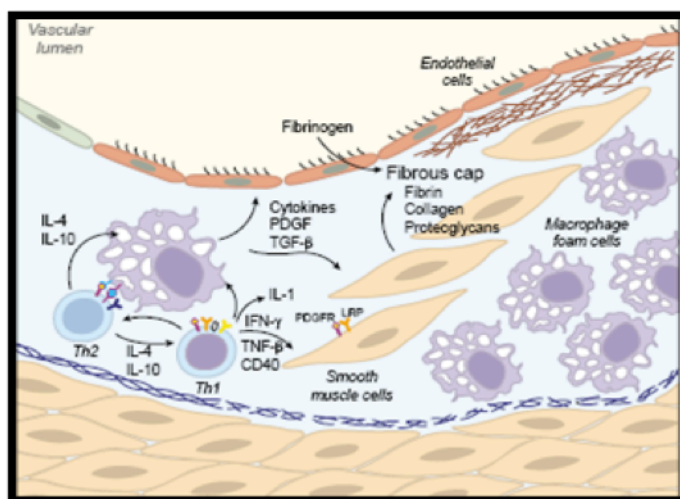
nítrico (NO)<sup>8</sup>, factores de crescimento, citocinas e quimiocinas. O aumento das propriedades de adesão em particular aos leucócitos e às plaquetas em circulação, um aumento da permeabilidade e a secreção de citocinas e factores de crescimento<sup>4</sup> favorece o transporte de LDL e a migração leucocitária para a camada íntima da artéria<sup>1</sup> o que contribui para o crescimento da placa aterosclerótica. Na parede arterial, as LDL poderão sofrer oxidação por ROS. Estas lipoproteínas oxidadas (ox-LDL) funcionam como mediadores inflamatórios, activando macrófagos<sup>9, 10</sup> e originando células espumosas<sup>1, 11</sup>. Diversas citocinas e quimiocinas são libertadas tanto pelas células espumosas como pelos macrófagos, como por exemplo interleucinas 1 e 8 (IL1 e IL8), interferão (IFN $\gamma$ ), factores de necrose tumoral alfa e beta (TNF  $\alpha$  e  $\beta$ ) que promovem a activação das células endoteliais sobrejacentes ao ateroma e expressam moléculas de adesão celular como VCAM-1, P e E selectinas, que atraem células do sistema imune e inflamatórias (monócitos, linfócitos B e T e mastócitos) e favorecem a sua migração para o interior da parede arterial (figura 1)<sup>1</sup>.



**Figura 1.** Processo aterosclerótico, estria gordá (Adaptada de <sup>1</sup>)

Também a acumulação de células espumosas na parede arterial contribui para o crescimento do ateroma e para a formação da cápsula fibrótica envolvente (figura 2)<sup>1</sup>, secretando factores de crescimento, como o PDGF e o TGF $\beta$  que vão induzir a proliferação das células musculares lisas (SMCs) presentes na camada média arterial e a secreção de colagénio para o espaço extra-celular.

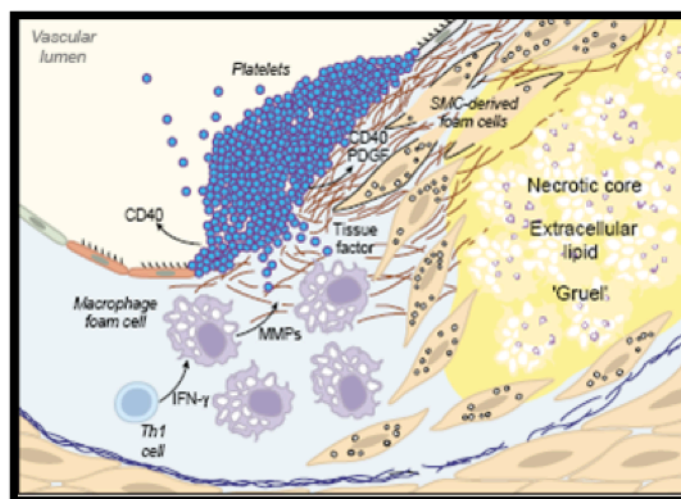




**Figura 2.** Processo aterosclerótico, placa fibrosa (Adaptada de<sup>1</sup>)

A formação da placa não é um processo contínuo, podendo haver fases de regressão e de crescimento, o que pode eventualmente conduzir a eventos cardíacos<sup>1</sup>.

As placas podem encontrar-se numa fase estável o que tem vindo a ser associado a uma predominância de SMCs embebidas numa matriz densa de colagénio. Estas placas apresentam um conteúdo baixo em células inflamatórias e libertam citocinas que permitem a sobrevivência das células endoteliais e das SMCs. As placas instáveis apresentam um maior conteúdo em células inflamatórias, em particular macrófagos e resíduos celulares, mas também células espumosas, e em que a cápsula fibrótica é pouco espessa<sup>12, 13</sup> devido à rápida remodelação o que favorece a sua ruptura e consequentemente a libertação do conteúdo da placa na corrente sanguínea e consequentemente, a formação de trombo<sup>1</sup>. A produção de diversas citocinas, de activação celular (e.g., IL1, IL2, IL4), pró-apoptóticas e de resposta imunitária (e.g., TNF $\beta$  e IFN $\gamma$ ), assim como a secreção de metaloproteínases da matriz (MMPs) pelos macrófagos activados que degradam a matriz extracelular, contribuem para a instabilidade da placa, para a degradação da cápsula fibrótica e eventualmente para o aumento de probabilidade de ruptura da placa (figura 3)<sup>1, 13</sup>. Devido à ruptura da placa são libertados os seus componentes na circulação sanguínea, que activam prontamente a cascata de coagulação e o recrutamento de plaquetas para o local da ruptura. A formação do trombo pode levar a eventos clínicos graves como o enfarte do miocárdio com ruptura não silenciosa e oclusão do vaso ou ruptura silenciosa em que a formação de trombo fica confinada à placa<sup>1</sup>.



**Figura 3.** Processo aterosclerótico, ruptura e formação do trombo (Adaptada de <sup>1)</sup>)

### 1.1.1. Lipoproteínas de baixa densidade oxidadas (ox-LDL) na aterosclerose

A oxidação das LDL é um dos processos chave na aterosclerose, desempenhando um papel crucial no desenvolvimento e progressão da placa<sup>10</sup>.

As ox-LDL estão envolvidas em vários passos da aterosclerose, promovendo o seu desenvolvimento. A oxidação dos ácidos gordos poli-insaturados das LDL leva à formação de produtos peroxidados como aldeídos, hidroperóxidos e oxiesteróis, contribuindo para o aumento de ROS, tendo consequências no funcionamento celular, induzindo a activação de proteossomas que estão implicados na activação de vias de transcrição de genes imunes e inflamatórios<sup>14, 15</sup>. A sua contribuição para o aumento do stress oxidativo está também relacionado com o facto de diminuir a produção de NO e aumentar a produção de superóxido pelas células endoteliais<sup>16</sup>. Deste modo, as ox-LDL podem participar na resposta local inflamatória induzindo stress oxidativo e aumento da expressão de citocinas, quimiocinas, MMPs, proteínas pró-trombóticas (e.g., factores tecidulares, PAI-1) e moléculas de adesão, via activação de vias de transcrição (e.g., NF- $\kappa$ B)<sup>15, 16</sup>. Estes processos induzem alterações nas propriedades adesivas do endotélio, promovem a adesão dos monócitos ao endotélio, a sua migração para a camada íntima e consequente diferenciação em macrófagos<sup>9, 10</sup> estando também envolvidas na retenção dos macrófagos na camada íntima<sup>17</sup>. A sua fagocitose e acumulação por parte dos macrófagos leva à formação das células espumosas, células estas que também desempenham um papel importante no desenvolvimento da placa aterosclerótica<sup>9, 10</sup>, como referido anteriormente. As ox-LDL são também responsáveis pelo recrutamento e activação de células inflamatórias<sup>9</sup> e a sua retenção na parede arterial, as quais interagem localmente com as células endoteliais e do ateroma que por sua vez segregam citocinas e factores de crescimento induzindo uma cascata inflamatória<sup>18</sup>.

Estudos *in vitro* demonstraram que as ox-LDL também activam os linfócitos T<sup>10</sup>. As ox-LDL funcionam assim como um auto-antígeno que leva a uma resposta imunitária adaptativa através da activação dos linfócitos T<sup>9</sup>. Foi também demonstrada a citotoxicidade das ox-LDL para uma grande variedade de células<sup>17</sup> em particular para os linfócitos T, macrófagos e células endoteliais<sup>10</sup> induzindo a sua apoptose. Verificou-se ainda que as ox-LDL são imunogénicas, estimulam a agregação plaquetária e alteram as propriedades vasomotoras do endotélio<sup>17</sup>. Deste modo as ox-LDL apresentam um papel funcional no desenvolvimento, erosão e ruptura da placa o que é de extrema relevância na doença coronária<sup>9, 19</sup>. A associação entre o aumento da concentração de ox-LDL no plasma e a doença coronária tem sido abordada em diversos estudos<sup>9, 18, 20, 21</sup>. Foi observada uma relação directa entre as concentrações de ox-LDL e a severidade de doença coronária, ou seja, concentrações elevadas de ox-LDL estão relacionadas com uma maior instabilidade da placa<sup>22</sup>. Nishi *et. al*<sup>23</sup> reporta a associação de elevadas concentrações de ox-LDL no plasma e na placa, com placas vulneráveis e instáveis cujo conteúdo em macrófagos está aumentado.

Assume-se que a oxidação das LDL ocorra preferencialmente na parede arterial. No entanto, a sua passagem para a corrente sanguínea não está clarificada. Vários estudos *in vitro* demonstraram que linfócitos, neutrófilos e macrófagos estão envolvidas na oxidação das LDL. Estas células acumulam-se na placa aterosclerótica, em especial em zonas de maior erosão, o que pode contribuir para o aumento da concentração de ox-LDL na circulação<sup>24, 25</sup>, talvez por difusão das lipoproteínas oxidadas da íntima para o sangue<sup>21</sup>. Destes modo, os níveis de ox-LDL no plasma, ou seja, em circulação poderão reflectir o estado da lesão aterosclerótica<sup>20</sup>. Estudos apontam para os níveis de ox-LDL como um bom marcador para identificação de doentes com doença coronária<sup>9, 18, 26</sup>.

Estudos anteriores do grupo revelaram uma relação positiva entre a diminuição dos níveis de ox-LDL e o aumento do número de linfócitos T na evolução do enfarte agudo do miocárdio<sup>27</sup> o que mais uma vez reforça a importância da relação entre as ox-LDL e as células imunitárias como indicador da ruptura da placa.

### **1.1.2. Perfil celular na aterosclerose**

O processo inflamatório na aterosclerose consiste na combinação de inflamação sistémica e na acumulação de leucócitos, monócitos/macrófagos, linfócitos e células dendríticas na placa aterosclerótica<sup>28</sup>. Os monócitos e os linfócitos são células mononucleadas do sangue periférico (CMNs) que se diferenciam dos leucócitos polimorfonucleares. Estes dois tipos celulares desempenham um papel muito importante no desenvolvimento e progressão da placa de ateroma.

Existe uma grande heterogeneidade nos conjuntos de leucócitos presentes na placa aterosclerótica, podendo estes ter tanto um efeito pró-aterogénico como anti-aterogénico<sup>28</sup>.

Os monócitos são células que circulam temporariamente no sangue e que ao migrarem para os tecidos se diferenciam em macrófagos ou em células dendríticas<sup>29</sup>.

Recentemente o papel dos monócitos e dos linfócitos na progressão da placa e na recuperação e remodelação dos tecidos afectados tem suscitado interesse<sup>28</sup> dada a sua actividade anti-inflamatória e pró-inflamatória<sup>28, 30</sup>. Observou-se em modelos animais<sup>31</sup> e em estudos post-mortem<sup>32</sup> que as lesões ateroscleróticas mais activas apresentavam um grande conteúdo em macrófagos e em células espumosas. Os linfócitos T e os macrófagos encontram-se em grande número em lesões iniciais, representando os linfócitos T cerca de 20% das células na cápsula fibrótica<sup>33, 34</sup>.

Os linfócitos podem ser divididos em três grandes grupos ou famílias, os linfócitos T, os linfócitos B e os NK<sup>29, 35</sup>, tendo os linfócitos T um papel preponderante na inflamação. Existem funcionalmente três tipos de linfócitos, os linfócitos T auxiliares ( $T_h$ , do inglês: helper), os linfócitos T citotóxicos ( $T_C$ ) e os linfócitos T reguladores (Treg). Todos estes linfócitos diferem na expressão das moléculas à sua superfície, sendo que os  $T_h$  são  $CD4^+$ , os  $T_C$   $CD8^+$  e os Treg são  $CD4^+$  ou  $CD8^+$ <sup>29</sup>. Os linfócitos T  $CD4^+$ , podem ser activados directamente por uma célula apresentadora de antígeno, como o macrófago, produzindo citocinas específicas que activam os linfócitos B e os linfócitos T  $CD8^+$ .

As células predominantes na resposta adaptativa são os linfócitos T  $CD4^+$ , sendo estas, as células predominantes na placa aterosclerótica em estado avançado<sup>28, 36, 37</sup>. Nas lesões estão presentes não só os linfócitos T  $CD4^+$ , como os T  $CD8^+$  nas várias regiões da placa, sendo que a população de linfócitos T  $CD4^+$ , é mais elevada do que a dos T  $CD8^+$ , na cápsula fibrótica<sup>34</sup>.

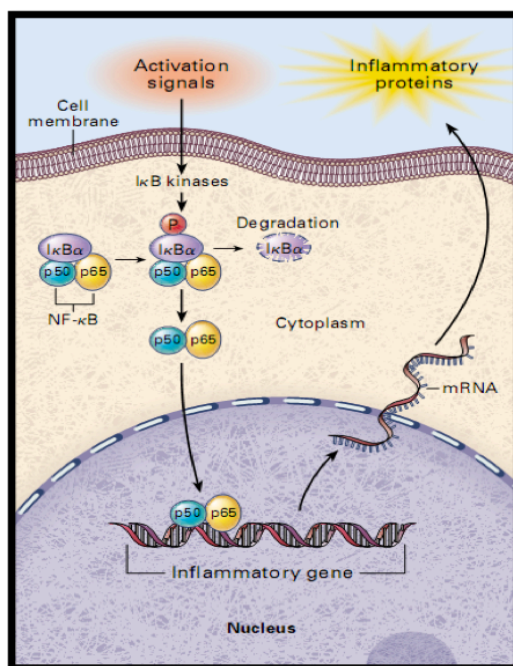
Os linfócitos  $T_h$  podem ser divididos em duas subpopulações diferentes  $T_{h1}$  e  $T_{h2}$  de acordo com o tipo de citocinas que secretam, resultando numa resposta celular por parte dos  $T_{h1}$  e uma resposta humoral por parte dos  $T_{h2}$ <sup>28, 37</sup>. Existe um balanço  $T_{h1}/T_{h2}$  em algumas doenças crónicas. Vários estudos apontam também para uma predominância de citocinas características das  $T_{h1}$  na aterosclerose<sup>13, 28, 36</sup>. Estes linfócitos produzem citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, tais como TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-2 e IL-12 que poderão estar envolvidas na progressão da lesão e na vulnerabilidade da mesma, recrutando mais células imunitárias, perpetuando a resposta inflamatória e influenciando a composição da matriz extracelular<sup>13, 28</sup>. Os linfócitos  $T_{h2}$  por sua vez, promovem a inflamação do tipo eosinófila alérgica. Estas células produzem citocinas IL-4, IL-5, IL-10 as quais têm uma função de controlo da resposta inflamatória<sup>2, 13, 28</sup>. Embora haja várias evidências que as  $T_{h2}$  têm um efeito inibidor e anti-aterogénico, outros estudos apontam para um efeito oposto<sup>37</sup>. Deste modo o papel das  $T_{h2}$  necessita ainda de ser estudado e aprofundado. Os linfócitos  $T_{h1}$  activam macrófagos, neutrófilos e linfócitos T citotóxicos que actuam removendo tecido danificado e na eliminação de micróbios por fagocitose. Os linfócitos  $T_{h2}$  estimulam a produção de anticorpos por parte das células B, que actuam na eliminação de toxinas e micróbios<sup>28</sup>.

## 1.2. O factor de transcrição nuclear kappa B como mediador da resposta inflamatória

Vários genes que têm sido implicados na regulação da resposta inflamatória, apoptose e defesa anti-oxidante estão parcialmente regulados pelo factor de transcrição nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B). O factor de transcrição nuclear kappa B é um dos reguladores primários da resposta inflamatória e imune tendo um papel crucial na iniciação e amplificação da inflamação, respondendo a estímulos pro-inflamatórios e levando à transcrição de genes de citocinas, quimiocinas, receptores imunes e moléculas de adesão<sup>38, 39</sup>.

O NF- $\kappa$ B representa uma família de 5 proteínas estruturalmente relacionadas e evolutivamente conservadas nos mamíferos, também conhecidas como *rel proteins*: Rel A (p65), Rel B, c-Rel (REL), NF- $\kappa$ B1 (p50 e o seu precursor p105) e NF- $\kappa$ B2 (p52 e o seu precursor p100)<sup>38-40</sup>. As proteínas partilham um domínio de homologia Rel N-terminal (RHD) com cerca de 300 aminoácidos, necessário para a dimerização, interacção com as proteínas inibitórias (I $\kappa$ B), translocação para o núcleo e ligação ao DNA<sup>38, 40, 41</sup>.

Nas células em repouso, os dímeros do NF- $\kappa$ B são retidos no citoplasma, por interacção com os inibidores da família I $\kappa$ B, na sua forma inactiva<sup>38-42</sup>. A forma activa do NF- $\kappa$ B é um heterodímero, constituído usualmente pelas proteínas p65 e p50 (figura 4)<sup>41</sup>. As restantes proteínas da família também formam heterodímeros, no entanto, não são tão comuns e estão envolvidos na activação de genes diferentes<sup>42</sup>. Existem várias isoformas do I $\kappa$ B, no entanto a mais comum e mais estudada, é o I $\kappa$ B $\alpha$ <sup>40, 43</sup>.



**Figura 4.** Diagrama esquemático da activação do NF- $\kappa$ B (Adaptada de<sup>42</sup>)

A via de sinalização NF- $\kappa$ B é induzida por uma grande variedade de sinais extracelulares que estão envolvidos tanto em respostas imunes, inatas como adaptativas e na regulação da apoptose<sup>38</sup>. Estes estímulos são variados, tais como mediadores apoptóticos, citocinas e seus receptores (IL-1, IL-2, IL-12, TNF $\alpha$ ), moléculas envolvidas no stress oxidativo (p.e., peróxido de nitrito) e físico, agentes químicos, produtos bacterianos e fungicidas, lipoproteínas modificadas (ox-LDL) entre outros<sup>40, 42</sup>.

A activação do NF- $\kappa$ B pode ocorrer por duas vias, a via canónica (clássica) ou a via alternativa (não canónica), iniciadas pelo NF- $\kappa$ B1 (p50/p105) e NF- $\kappa$ B2 (p52/p100), respectivamente<sup>38, 40</sup>. A via canónica é a que está relacionada com a resposta inflamatória e sobrevivência das células do sistema imune através da expressão coordenada de múltiplos genes inflamatórios e de imunidade inata<sup>38</sup>. Na via canónica de activação, o complexo I $\kappa$ B kinase (IKK) fosforila dois resíduos de serina conservados do domínio N-terminal do I $\kappa$ B. Estes resíduos fosforilados levam à imediata poliubiquitinação das proteínas do I $\kappa$ B pelo complexo SCF- $\beta$ -TrCP, sendo posteriormente degradadas nos proteossomas 26S<sup>38, 40</sup>. Esta degradação leva à libertação e activação do NF- $\kappa$ B que é translocado para o núcleo onde se vai ligar a sequências específicas de promotores de genes alvo regulando a transcrição de mais de 400 genes que codificam quimiocinas, citocinas, moléculas de adesão, enzimas relacionadas com a inflamação e inibidores da apoptose. Estes genes estão assim, relacionados com a imunoregulação, regulação do crescimento, inflamação, carcinogénese e apoptose (figura 4)<sup>38, 40, 42</sup>. O NF- $\kappa$ B está também envolvido na síntese do seu inibidor, I $\kappa$ B $\alpha$ , visto que o seu gene tem uma sequência de reconhecimento  $\kappa$ B no seu promotor. O NF- $\kappa$ B induz desta forma a síntese do I $\kappa$ B $\alpha$ , que se acumula tanto no citoplasma como no núcleo. Quando presente no núcleo, liga-se ao NF- $\kappa$ B nuclear, dissociando-o do DNA e transportando-o para o citoplasma, terminando, desta forma, a expressão génica<sup>38, 41, 42</sup>. Este *loop* de expressão *de novo* do gene do I $\kappa$ B $\alpha$  pelo NF- $\kappa$ B é um dos mecanismos de regulação deste factor de transcrição quando no seu estado activo<sup>38</sup>. Em algumas células, tais como os linfócitos T periféricos, o I $\kappa$ B $\alpha$  é, não só expresso no citoplasma, como no núcleo. O I $\kappa$ B $\alpha$  nuclear não é sensível à degradação tal como acontece no citoplasma sendo necessária uma exportação eficiente deste inibidor do núcleo, não só para a indução da repressão da transcrição, mas também para manter um nível baixo de I $\kappa$ B $\alpha$  nuclear de forma a permitir a transcrição por parte do NF- $\kappa$ B após activação celular<sup>41</sup>. A regulação da actividade transcricional do NF- $\kappa$ B também ocorre no núcleo através de fosforilações, acetilações e associação com outros factores<sup>43</sup>.

Como já referido, existem várias isoformas do inibidor I $\kappa$ B. A família dos inibidores, I $\kappa$ B, consiste em três subgrupos: os I $\kappa$ Bs clássicos (I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , I $\kappa$ B $\gamma$ ), os precursores do NF- $\kappa$ B (p100 e p105) e os I $\kappa$ Bs pouco usuais (Bcl-3, I $\kappa$ B- $\xi$ , I- $\kappa$ B $\text{NS}$ ). Estes funcionam inibindo a sequência de localização nuclear (NLS) no domínio de homologia Rel de uma das subunidades do heterodímero p50/p65, sequência esta que permite que o complexo NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B entre e saia do núcleo<sup>38</sup>. Nas células em repouso, o NF- $\kappa$ B constituído pelas subunidades p50 e p65 é inibido por um dos vários I $\kappa$ Bs, sendo o I $\kappa$ B $\alpha$  o mais comum<sup>40</sup>. O complexo I $\kappa$ B kinase (IKK), responsável pela fosforilação dos I $\kappa$ Bs, é constituído por duas

subunidades catalíticas activas, IKK $\alpha$  (IKK1), IKK $\beta$  (IKK2) e a subunidade estrutural e de regulação IKK $\gamma$  (também conhecida por modulador essencial do NF- $\kappa$ B\_ NEMO)<sup>38</sup>.

A activação constitutiva do NF- $\kappa$ B é frequentemente encontrada em doentes com condições inflamatórias crónicas como cancro, doenças pulmonares (asma), cardiovasculares (aterosclerose), auto-imunes (artrite reumatóide), neurodegenerativas (esclerose múltipla) e de pele (psoríase)<sup>39, 40</sup>.

### 1.2.1. NF- $\kappa$ B na aterosclerose

O NF- $\kappa$ B desempenha um papel importante no desenvolvimento da aterosclerose como transdutor de estímulos e activação celular, conduzindo à expressão de genes de citocinas, factores de crescimento, receptores imunes, moléculas de adesão entre outros, que promovem a inflamação<sup>13,44</sup>. É activado por diversos factores pró-aterogénicos, como citocinas, quimiocinas e ox-LDL e também, por produtos da lipoperoxidação<sup>14, 40, 42</sup>.

A relação entre as doenças inflamatórias e a activação do NF- $\kappa$ B tem sido descrita na literatura. O envolvimento do NF- $\kappa$ B na aterosclerose foi demonstrado pela primeira vez em 1996 por Brand e colaboradores<sup>45</sup> pela sua presença na forma activada em placas (SMC, macrófagos e células endoteliais). Mais recentemente e utilizando modelos animais, foi demonstrado que a inactivação do NF- $\kappa$ B impedia a formação de células espumosas<sup>46</sup>.

Estudos em modelos animais demonstraram que existe uma relação entre a hipercolesterémia, um dos factores de risco da aterosclerose, e a activação do NF- $\kappa$ B<sup>47</sup> e que regiões mais propensas a desenvolverem aterosclerose<sup>48</sup> têm níveis mais elevados de diferentes componentes do NF- $\kappa$ B<sup>49</sup>.

Existem várias evidências obtidas a partir de estudos em modelos animais, para a contribuição do NF- $\kappa$ B em diferentes fases da formação da placa aterosclerótica, desde a sua iniciação e nos processos de formação das SMCs, inflamação, morte celular, migração e proliferação de células<sup>43</sup>. Poderá estar relacionado com o início da aterosclerose em processos como a modificação de lípidos, quimiotaxia e adesão, por estar envolvido na regulação de enzimas relacionadas com a modificação das LDL, com a regulação da proteína quimioattractiva de monócitos 1 (MCP-1) e também com a regulação de moléculas de adesão<sup>43</sup>. Verificou-se que o NF- $\kappa$ B regula o factor de diferenciação de monócitos/macrófagos, M-CSF, diferenciação esta caracterizada pelo aumento de expressão de receptores específicos para as LDL modificadas, podendo também estar envolvido na formação das células espumosas<sup>43</sup>.

Quer o papel do NF- $\kappa$ B quer das próprias citocinas na aterosclerose não se encontram totalmente clarificados. O NF- $\kappa$ B regula citocinas envolvidas na inflamação e portanto no processo aterosclerótico, como a IL-10 e a IL-4 que têm um papel anti-inflamatório e por outro lado citocinas como o TNF e o IFN $\gamma$  que têm um papel pró-inflamatório<sup>43</sup>.

O NF- $\kappa$ B é também um mediador na regulação de factores anti-apoptóticos, ou seja, está envolvido na expressão de genes cujos produtos estão envolvidos na supressão

da apoptose<sup>50</sup>, e desta forma pode ser considerado como anti-aterogénico. A transcrição de factores de regulação do ciclo celular pelo NF- $\kappa$ B tem implicações na proliferação das SMCs que contribuem para a formação da cápsula fibrótica e estabilização da placa, podendo assim contribuir como um factor positivo na doença<sup>43</sup>.

Deste modo o NF- $\kappa$ B pode desempenhar acções pró e anti-inflamatórias com vista ao controlo fisiológico deste processo. Com recurso a modelos de inflamação (*air pouch model*) e outros modelos animais verificou-se em leucócitos que a activação do NF- $\kappa$ B no início da inflamação está associada a um papel pro-inflamatório e à expressão de genes pro-inflamatórios e a sua activação durante o fim/resolução da inflamação está associada a um papel anti-inflamatório, ou seja à expressão de genes anti-inflamatórios e indução da apoptose<sup>51</sup>.

### **1.3. Importância da via de transcrição do NF- $\kappa$ B e da ox-LDL na doença coronária**

Estudos clínicos tem vindo a reforçar a importância do NF- $\kappa$ B na doença coronária. Wilson e colaboradores observaram em doentes com anginas estável e instável submetidos a aterectomia arterial, imunoreactividade do NF- $\kappa$ B em componentes celulares da placa aterosclerótica (macrófagos, células espumosas e SMCs) sendo a expressão do NF- $\kappa$ B mais elevada nos doentes com angina instável<sup>52</sup>. Foi também reportado o aumento da expressão de NF- $\kappa$ B activo nas CMNs do sangue periférico de doentes com angina instável, relativamente a doentes com angina estável<sup>53</sup>. Indivíduos sem doença coronária apresentaram níveis reduzidos de NF- $\kappa$ B em CMNs isoladas do sangue periférico<sup>54</sup>. Liuzzo *et al.* verificaram que existe uma associação entre uma activação persistente do NF- $\kappa$ B e a recorrência de eventos agudos<sup>55</sup>, havendo uma associação entre activação do NF- $\kappa$ B e a instabilidade da doença. Estudos em doentes com insuficiência cardíaca revelaram que o NF- $\kappa$ B se encontrava activo nos leucócitos periféricos<sup>56</sup> e nas CMNs quando comparado com indivíduos saudáveis<sup>57</sup>.

Estudos *in vitro* sugerem que o mecanismo subjacente à activação dos monócitos e também dos linfócitos (CMNs) por parte da ox-LDL é a via de transcrição do NF- $\kappa$ B. Foi demonstrado que células endoteliais e monócitos/macrófagos expostos a LDL oxidada activavam o NF- $\kappa$ B<sup>58</sup>, em particular o NF- $\kappa$ B constituído pelas subunidades p50/p65<sup>59</sup>. Em 2005 foi demonstrado, por Cominacini *et al.*<sup>54</sup>, em culturas primárias de monócitos isolados de indivíduos com doença coronária e com níveis elevados de ox-LDL no plasma, que os níveis de activação do NF- $\kappa$ B nos monócitos eram dependentes da concentração de ox-LDL no meio de cultura. Estes resultados apontam para uma relação entre os níveis de activação do NF- $\kappa$ B observado nos monócitos dos doentes com angina instável e concentração mais elevadas de ox-LDL no plasma. Chen *et al.*<sup>16</sup> demonstrou que uma exposição longa a ox-LDL pode levar à activação de monócitos, aumentando a produção de anião superóxido e activar a via de transcrição do NF- $\kappa$ B, aumentando as propriedades adesivas ao endotélio.



O papel da ox-LDL na activação do NF- $\kappa$ B apresenta no entanto, diferentes facetas. Em estudos *in vitro* foi observado que incubações de curta duração de monócitos com ox-LDL ou a utilização de baixas concentrações de ox-LDL aumentavam a activação do NF- $\kappa$ B e a expressão de genes de interleucinas (IL-8) e TNF- $\alpha$  <sup>60, 61</sup>. Por outro lado, a utilização de tempos de incubação maiores ou concentrações mais elevadas inibem respostas inflamatórias mediadas pelo NF- $\kappa$ B por parte de monócitos<sup>61</sup> e macrófagos<sup>60, 62-64</sup>. Um outro estudo *in vitro* demonstrou também que uma longa exposição de macrófagos a ox-LDL leva a modificações no factor de transcrição levando a uma diminuição da sua afinidade de ligação ao DNA<sup>65</sup>.

## 2. Objectivos

---

Foram demonstradas associações entre os níveis de ox-LDL no plasma e a doença coronária. Estudos *in vitro* e *in vivo* atribuem às ox-LDL a capacidade de activação dos linfócitos T e do factor de transcrição NF- $\kappa$ B.

O objectivo principal desta tese de mestrado foi o de investigar a relação entre os níveis de ox-LDL no plasma e a activação da via de transcrição do NF- $\kappa$ B nas células mononucleadas do sangue periférico (CMNs) em indivíduos com doença coronária e em indivíduos saudáveis.

Para atingir este objectivo serão abordados os seguintes aspectos:

1. a identificação e caracterização das populações de leucócitos CD4, CD8 e monócitos, assim como a activação linfocitária por citometria de fluxo;
2. a determinação dos níveis de ox-LDL no plasma por ELISA;
3. desenvolvimento de métodos de isolamento de CMNs a partir do sangue periférico e de separação de fracções celulares;
4. detecção da activação da via do NF- $\kappa$ B nas CMNs totais e fracções celulares por *Western blotting*.

A relação dos indicadores medidos com a doença será avaliada pela correlação destes parâmetros com dados fisiológicos e bioquímicos dos doentes.

Com este trabalho, espera-se inferir a importância entre a activação linfocitária e os níveis de ox-LDL na doença. Espera-se também estabelecer metodologias que permitam a avaliação do estudo da via de sinalização do NF- $\kappa$ B *in vivo*, a partir do sangue periférico.

## 3. Materiais e Metodologia

---

### 3.1. Grupos de estudo

Esta tese de mestrado está incluída num projecto em curso de investigação clínica designado por “Interrelação dos marcadores sanguíneos da apoptose e da função endotelial com a composição da placa utilizando VH IVUS” (Fundação para a Ciência e Tecnologia, PIC/IC/82734/2007). Deste modo, os grupos de estudo do presente trabalho foram constituídos no âmbito deste projecto.

Foram estudados indivíduos com doença coronária (grupo de indivíduos com patologia\_ PAT) e indivíduos saudáveis (grupo de indivíduos controlo\_ CTR) seleccionados a partir dos grupos estabelecidos no referido projecto. O grupo CTR foi constituído por voluntários sem manifestações de doença cardiovascular e o grupo PAT foi constituído por indivíduos com doença coronária confirmada e submetidos a angioplastia.

Ambos os grupos foram recrutados no serviço de cardiologia do Hospital Santa Marta em Lisboa. Todos os participantes foram informados dos objectivos do estudo e assinaram um consentimento informado, submetido e aprovado pela comissão de ética do Hospital de Santa Marta.

#### 3.1.1. Caracterização dos grupos de estudo

Aquando da inclusão no estudo dos indivíduos do grupo controlo e doentes foram registados dados demográficos, fisiológicos, clínicos e bioquímicos.

Parâmetros como o sexo, idade, peso, factores de risco, antecedentes clínicos, diabetes e medicação foram registados, assim como os parâmetros fisiológicos, tensão arterial e frequência cardíaca. Os parâmetros bioquímicos recolhidos compreenderam hemograma, glicemia, metabolismo lipídico, indicadores inflamatórios (CRP), função cardíaca (troponina) e ventricular (NT-proBNP).

A hipertensão é uma situação de valores de tensão arterial aumentados onde normalmente se considera valores de tensão arterial sistólica iguais ou superiores a 140mm Hg e/ou valores de tensão arterial diastólica superiores a 90mm Hg. A dislipidemia é uma situação de valores anormais de lípidos e/ou lipoproteínas no sangue. São normalmente avaliados os níveis plasmáticos de colesterol total, HDL, LDL e triglicéridos. São considerados valores normais para o colesterol total, valores entre os 140 mg e os 200 mg por decilitro de sangue (mg/dl) ou inferiores. Relativamente às LDL os valores devem ser inferiores a 130 mg/dl e das HDL devem ser superiores a 40 mg/dl<sup>66</sup>.

Os indivíduos do grupo controlo foram também submetidos a exames complementares de diagnóstico das doenças cardíacas: ecocardiograma com prova de esforço e tonometria arterial periférica (PAT), método recente que permite avaliar a função

do endotélio da vasculatura arterial periférica, medida através do EndoPat (Itamar Medical).

### **3.2. Metodologia**

#### **3.2.1. Recolha de amostras de sangue dos doentes e do grupo controlo**

A recolha de sangue dos doentes e dos indivíduos do grupo controlo realizou-se no Serviço de Cardiologia do Hospital Santa Marta. A recolha de sangue do grupo controlo foi efectuada em jejum, antes das provas complementares realizadas, ecocardiograma com prova de esforço e PAT (EndoPat, Itamar Medical). A recolha de sangue dos doentes foi realizada durante a angioplastia.

O sangue de ambos os grupos foi recolhido em tubos (*Vacurette* de 2 ml e 5 ml) com anticoagulante (EDTA). O sangue manteve-se refrigerado a 4 °C até realização dos protocolos de separação das células mononucleadas (CMNs) e caracterização das populações linfocitárias por citometria.

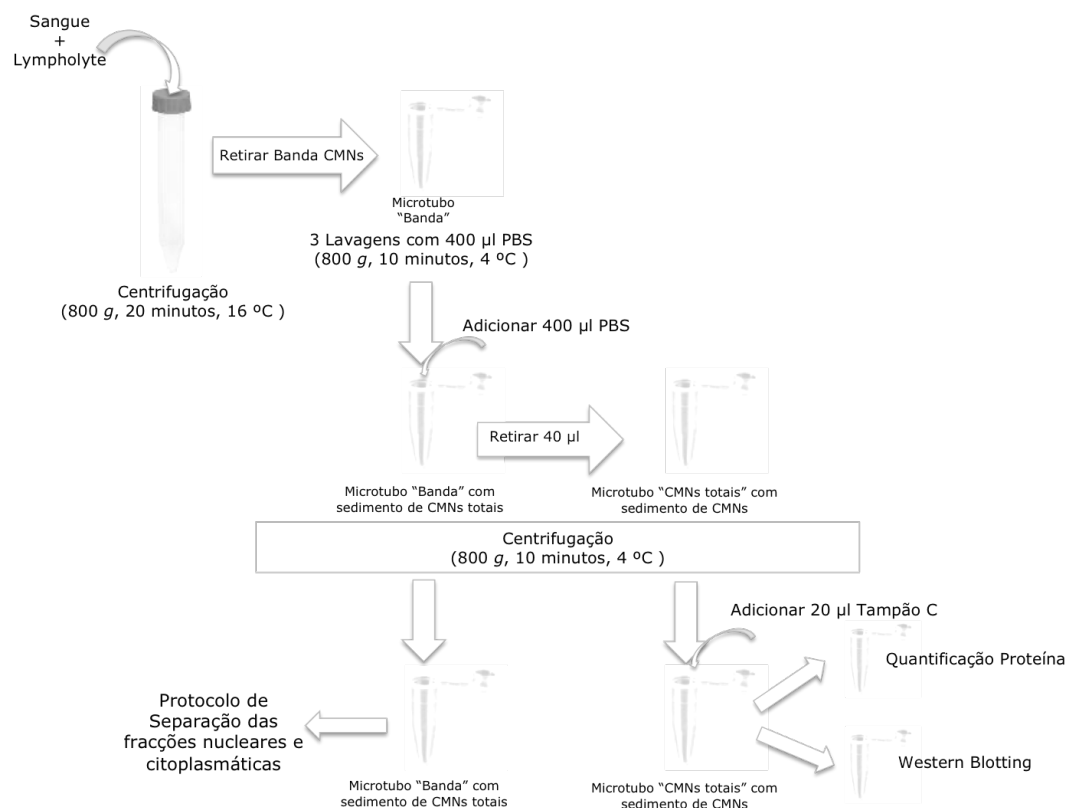
Para posterior quantificação das ox-LDL por ELISA foi utilizado plasma obtido a partir de sangue total EDTA por centrifugação durante 10 minutos, a 250 *g*. Separaram-se três alíquotas para tubos devidamente etiquetados e armazenaram-se a -80 °C até à análise por ELISA.

#### **3.2.2. Separação das células mononucleadas do sangue periférico**

A separação das CMNs foi efectuada por gradiente de densidade, num meio específico Lympholyte®-H (CEDARLANE® Laboratories Limited), de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante<sup>67</sup>. Este procedimento foi efectuado até 4 h após recolha do sangue de modo a evitar hemólise dos eritrócitos e alteração dos leucócitos.

Para a separação das CMNs foram utilizados 2 a 3 ml de sangue total com EDTA diluído em PBS (diluição 1:1 v/v). O protocolo de separação das CMNs totais encontra-se esquematizado na Figura 5 e em pormenor no Anexo II.1. O procedimento consiste em pipetar com muito cuidado o sangue total com EDTA sobre o Lympholyte®-H evitando a mistura de ambos. Como o Lympholyte®-H tem uma densidade mais elevada, forma-se uma interface distinta. A suspensão é centrifugada após o que é visível uma banda de células entre as camadas de Lympholyte®-H e de soro. Retirou-se a banda cuidadosamente com o auxílio de uma pipeta de Pasteur e de seguida removeram-se os resíduos de Lympholyte®-H e de soro por centrifugação adicionando-se PBS e descartando o sobrenadante após cada lavagem. O sedimento resultante que contém as CMNs totais foi ressuspensionado em PBS e dividido. Uma alíquota de CMNs totais foi utilizada para a quantificação de proteína e a outra para a determinação da expressão de NF-κB por

*Western Blotting* (armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ ). O restante volume foi utilizado na separação de fracções citoplasmáticas e nucleares.



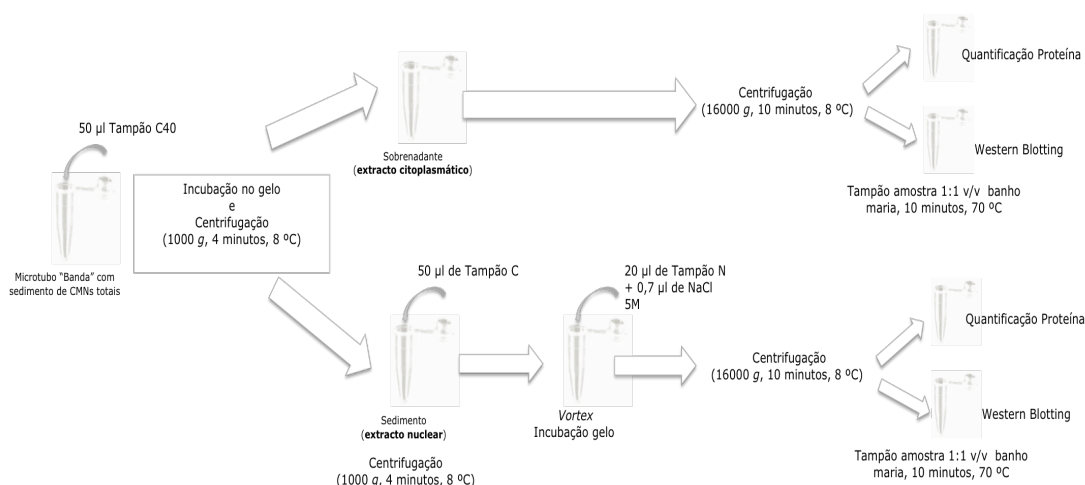
**Figura 5.** Esquema do protocolo de " Separação das células mononucleadas do sangue periférico"

### 3.2.3. Separação das fracções nucleares e citoplasmáticas

Após isolamento das CMNs procedeu-se à separação das fracções nucleares e citoplasmáticas. O protocolo utilizado foi adaptado de um protocolo online<sup>68</sup> em que são utilizados tampões específicos (ver Anexo I.1): Tampão C40 (incubação das CMNs totais para separação das fracções citoplasmáticas e nucleares), Tampão C e Tampão N (para purificação da fracção nuclear e estabilização dos núcleos).

O protocolo encontra-se esquematizado na figura 6 e em pormenor no Anexo II.2. Resumidamente, os extractos são obtidos por centrifugação a partir do sedimento de CMNs totais ressuspensionado no tampão C40, após incubação em gelo. O sobrenadante constitui o extracto citoplasmático e o sedimento o extracto que contém os núcleos. As duas alíquotas são tratadas segundo o protocolo, e as duas fracções celulares são finalmente recolhidas após uma centrifugação a  $16000\text{ g}$ , para sedimentar detritos celulares. No final os dois sobrenadantes, um que contém os extractos citoplasmáticos e o outro os extractos nucleares das CMNs foram subdivididos em duas alíquotas. Uma das alíquotas de cada extracto foi utilizada para quantificação de proteína e a segunda para o *Western Blotting*. Todas as alíquotas (extractos citoplasmáticos e nucleares) foram armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$

até à quantificação de proteína pelo método de Lowry e detecção do NF- $\kappa$ B por *Western Blotting*.



**Figura 6.** Esquema do protocolo de "Separação das fracções citoplasmáticas e nucleares"

Em algumas das amostras a separação das fracções citoplasmáticas e nucleares foi feita no dia seguinte à recolha do sangue e separação das CMNs pelo método descrito no ponto 3.3.2.. Nestes casos a banda de CMNs foi diluída em PBS e armazenada a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 3.2.4. Detecção e avaliação da expressão do NF- $\kappa$ B

#### 3.2.4.1. Quantificação da proteína nos extractos celulares pelo método Lowry

Utilizou-se o método de Lowry modificado<sup>69</sup> para a quantificação da proteína total das CMNs totais e dos extractos citoplasmáticos e nucleares. O método de Lowry é um dos mais utilizados na quantificação de proteínas devido à sua simplicidade, precisão e sensibilidade. O método de Lowry baseia-se na reacção do reagente Folin-Ciocalteu (mistura de molibdato, tungstato e ácido fosfórico) com as ligações peptídicas das proteínas em presença de cobre (II) e de tartarato de sódio e potássio (estabilizador do reagente), produzindo-se um composto de cor azulada com absorção máxima a 750 nm. O método utilizado consiste em três passos: 1- ligação com reagente de cobre e tartarato; 2- reacção com o reagente Folin-Ciocalteu; 3- Desenvolvimento do complexo corado e leitura espectrofotométrica a 750 nm.

O protocolo de quantificação da proteína encontra-se em pormenor no Anexo II.3. Cada ensaio foi realizado tendo como padrão de calibração a albumina de soro bovino (BSA). Sempre que possível foram efectuadas réplicas para cada amostra. A média das absorvências para cada padrão e amostra foi calculada após subtracção do valor da absorvência do branco. A recta de calibração foi calculada a partir da absorvência média dos padrões (ordenadas) e da quantidade de BSA adicionada (abscissas). A quantidade de

proteína das amostras foi calculada a partir do ajuste da recta, multiplicando-se pelo factor de diluição, sendo os valores de proteína dos extractos expressos em µg/ml.

### 3.2.4.2. Western Blotting

Utilizou-se o *Western Blotting* para a detecção e avaliação da expressão do NF-κB nas CMNs. Para tal, foram utilizados amostras de CMNs totais e extractos nucleares e citoplasmáticos. O sistema utilizado para a análise electroforética das proteínas dos extractos celulares foi o NuPAGE® Novex Midi Gel System (Invitrogen) adaptando o protocolo fornecido pelo fabricante<sup>70</sup>. Todos os reagentes e tampões utilizados são próprios para o sistema NuPAGE® (Anexo I.3).

O protocolo pormenorizado encontra-se no Anexo II.4. Sucintamente, em primeiro lugar aqueceram-se as amostras (extractos proteicos diluídos em tampão de amostra NuPAGE®) uma vez que se pretendia fazer o seu fraccionamento numa electroforese desnaturante. Montou-se o sistema de electroforese XCell4 *Sure Lock*™ (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante com o gel pré feito e o tampão de corrida; aplicou-se a cada poço do gel um volume apropriado de amostra (tabela 1), com a mesma quantidade de proteína (2,5 µg) em todas as amostras, e um volume apropriado de marcador de massa molecular (Novex® Sharp Protein Standard Pre-stained); efectuou-se a electroforese a 200 V durante 55 minutos. Após a electroforese procedeu-se à transferência do gel para uma membrana de PVDF. Montou-se uma *sandwich* de transferência (gel, membrana e esponjas) e o sistema de acordo com as instruções do fabricante e transferiu-se a 20 V durante 1 hora e 30 minutos.

**Tabela 1.** Volumes de amostra utilizados em cada *western* realizado (A, B e C)

	teste A		teste B			teste C	
	citoplasmas	totais	Citoplasmas	núcleos	totais	Citoplasmas	Núcleos
Volume	20 µl	20 µl	15 µl	10 µl	15 µl	15 µl	10 µl

Para o imunodetecção foram utilizados anticorpos específicos para a subunidade p65 do NF-κB (NFκB p65 (C-20): sc-372, SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC.) e para a α-tubulina (α Tubulin (E-19)-R: sc-12462-R, SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC.), este último como controlo do fraccionamento e integridade da proteína. Utilizou-se o *FemtoMax*™ *Super sensitive Chemiluminescent Substrate Kit for Immunoblotting* que inclui o anticorpo secundário compatível com os dois anticorpos primários e o SNAP i.d. (MILLIPORE™) que é um sistema que permite a redução dos tempos da imunodetecção, adaptando o protocolo fornecido pelo fabricante<sup>71, 72</sup>.

### 3.2.5. Identificação das populações de leucócitos por citometria de fluxo

Os leucócitos foram identificados e caracterizados por citometria de fluxo, através de um conjunto de anticorpos monoclonais conjugados com diferentes fluorocromos (BD Biosciences, USA).

O protocolo de identificação das populações de leucócitos por citometria de fluxo encontra-se em pormenor no Anexo II.5. De um modo sucinto, 100 µl de sangue total EDTA foi incubado no escuro durante 25 minutos com os anticorpos específicos. Seguidamente as células foram lavadas em tampão PBS e fixadas. Para cada amostra prepararam-se 4 tubos distintos (ver Tabela 2) para determinação da 1) auto-fluorescência da amostra (L-AF); 2) para identificação dos linfócitos CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> (L-CD4CD8); 3) para identificação dos linfócitos activados (L-ACT); e 4) para identificação dos monócitos (L-Monoc).

**Tabela 2.** Combinação de fluorocromos e anticorpos para a análise de populações de linfócitos e de monócitos por citometria de fluxo

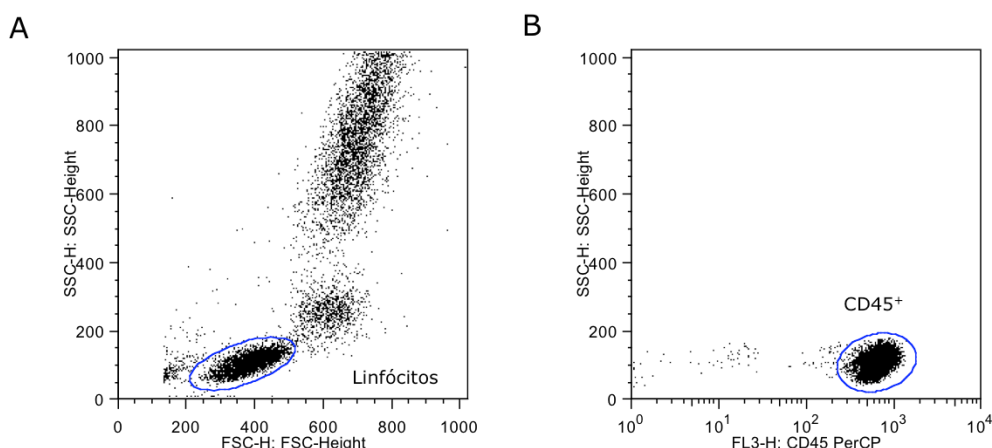
Tubo	Acronimo	PerCP	FITC	PE	APC
Auto-Fluorescência	L-AF	-	-	-	-
Linfócitos	L-CD4CD8	CD45, 5µl	CD3, 5µl	CD8, 10 µl	CD4, 10 µl
Linfócitos activados	L-Act	CD45, 5µl	CD3, 5µl	-	CD69, 10µl
Monócitos	L-monoc	-	-	CD11b, 10µl	-

A análise foi efectuada no citómetro de fluxo, FACS Calibur (BD Biosciences, USA) e a análise dos dados foi feita com recurso ao Software FlowJo 9.0.2 (versão Macintosh).

Todas as amostras foram analisadas com a mesma calibração do citómetro. A calibração (*settings*) estabelece os valores óptimos para os conjuntos de fluorocromo-anticorpo utilizados, das voltagens dos detectores e da percentagem de sobreposição espectral ou interferência de comprimentos de onda dos espectros de emissão detectados pelos detectores (compensações).

A análise compreendeu inicialmente a selecção das populações a partir das suas características físicas, tamanho através da informação de dispersão frontal (*forward scatter*), e complexidade através da dispersão lateral (*side scatter*). A selecção das populações de células foi efectuada num gráfico de densidade (*dot plot*) em que cada ponto representa uma célula que passou no sistema de detecção (Figura 7 A). Seguidamente seleccionam-se as regiões de interesse (*gate*) para definir a marcação positiva com anticorpo e fluorocromos específicos. No caso dos linfócitos utilizou-se o fluorocromo CD45 (PerCP) que apresentam uma baixa intensidade em dispersão lateral, mas elevada para CD45 (Figura 7 B).





**Figura 7-** Representação gráfica da identificação da população de linfócitos; (A) *Dot Plot* definido em *Side Scatter* (SSC), *Forward scatter* (FSC) representativo da população de linfócitos; (B) *Dot Plot* representativo do gate da população de linfócitos CD45<sup>+</sup>, definida dentro da população de linfócitos.

Na análise de cada amostra estabeleceu-se o limiar de detecção positiva para cada fluorescência a partir do tubo de auto-fluorescência, ou seja definiu-se o intervalo de auto-fluorescência da amostra e consequentemente a região a partir da qual todos os eventos detectados nas células marcadas serão considerados positivos. O software de aquisição de dados calcula a percentagem de eventos positivos (ou células positivas) que estão contidos num dado intervalo seleccionado no histograma de cada fluorescência resultante da aquisição da amostra sem marcação (auto-fluorescência). Este limite foi fixado a 5% para os anticorpos com expressão mais significativa (CD45, CD4, CD8, CD11b) e a 10% para CD69 (ver Figuras 1, 2 e 3 do Anexo III). Este limite foi também fixado nos *dot-plots* correspondentes.

### 3.2.6. Quantificação das ox-LDL por ELISA

A quantificação das ox-LDL no plasma foi realizada através da técnica ELISA com recurso ao *Kit* comercial da Mercodia (Uppsala, Suécia).

Neste *Kit* foram utilizadas amostras de plasma obtido através de sangue total com anticoagulante EDTA. As amostras de plasma foram armazenadas a -80 °C até serem utilizadas. Para a quantificação da ox-LDL foi seguido o protocolo recomendado pelo fabricante<sup>73</sup>.

O protocolo de quantificação da ox-LDL encontra-se em pormenor no Anexo II.6. Sucintamente, as amostras previamente diluídas, os calibradores e os controlos, foram incubados com tampão de ensaio e depois com o conjugado enzimático. Entre as incubações fizeram-se lavagens de modo a remover componentes não reactivos e restos de anticorpos não ligados. Seguidamente incubou-se com o substrato TMB, que permite a detecção do conjugado enzimático, e posteriormente parou-se a reacção adicionando a solução stop. Determinou-se a densidade óptica de cada poço, medindo a absorbância

num espectrofotómetro multi-canal a  $\lambda = 450 \text{ nm}$  (Cary, Varian). Após leitura foi feita a recta de calibração para a série de concentrações preparadas a partir de cada amostra padrão de ox-LDL fornecida no kit. As concentrações de ox-LDL de cada amostra foram calculadas a partir da recta de calibração tendo sempre em atenção o factor de diluição e expressas em (U/l).

Utilizou-se ainda um controlo para validação do método. O controlo é constituído por dois padrões, um de concentração elevada (*H-High*) e um padrão de concentração baixa (*L-low*). As concentrações dos padrões variam em função do lote. Nos padrões utilizados as concentrações para a gama elevada H era de 7,6-18,7 mU/l e de 10-19 mU/l, enquanto que para a gama baixa L, as concentrações indicadas foram de 2,7-8,5 mU/l e de 4,6-7,7 mU/l.

### **3.2.7. Análise Estatística**

A análise estatística compreendeu uma análise exploratória de todas as variáveis para avaliar a distribuição dos valores e identificar valores limite. Foram calculadas medianas, interquartis, médias e respectivos desvios padrão. As diferenças entre grupos para as variáveis categóricas foram avaliadas pelo método de *Chi-square*. Para as variáveis contínuas, as diferenças entre grupos foram estimadas utilizando métodos não paramétricos (Mann-Whitney, Kolmogorov-Smirnov, e Kruskal-Wallis) e paramétricos (teste t de Student) no caso da distribuição das variáveis ser normal.

Os grupos foram considerados diferentes quando se verificou significância ( $p < 0,05$ ) em pelo menos dois testes não paramétricos ou no caso da distribuição normal, pode ser assumida no teste t de *Student* e um teste não paramétrico. As inter-relações das variáveis estudadas para cada grupo foram estimadas por análise de correlações (método não-paramétrico de Spearman). Utilizou-se o programa estatístico SPSS Inc. V17.0 e o Excel para Mac V12.1.0.

## 4. Resultados

---

### 4.1. Análise e caracterização dos grupos em estudo

Como já foi referido, neste trabalho foram constituídos 2 grupos, o grupo de indivíduos saudáveis (CTR) e o grupo de doentes com doença coronária (PAT).

A caracterização destes dois grupos consistiu na recolha de dados demográficos e fisiológicos, factores de risco e medicação (Tabela 3) e dados biológicos e bioquímicos (Tabela 4).

Os grupos constituídos são semelhantes em termos de média de idades, dados fisiológicos e factores de risco (Tabela 3).

No que respeita à prevalência de factores de risco nos grupos PAT e CTR, e embora o número de indivíduos em cada classe não tivesse permitido uma análise estatística, os dois grupos apresentaram diferenças no que respeita ao historial familiar (ver Tabela 3). No grupo CTR não se verificaram antecedentes de EAM e AVC ao contrário do grupo de doentes. No entanto, em ambos os grupos verificaram-se antecedentes de CAD. Tanto no grupo CTR como no grupo PAT foram registados indivíduos com factores de risco, como hipertensão, dislipidemia e hábitos tabágicos. Observou-se uma maior percentagem de indivíduos do grupo CTR com dislipidemia e uma maior percentagem de indivíduos do grupo PAT com hipertensão e hábitos tabágicos (Tabela 3). Quer no grupo CTR quer no grupo PAT nenhum indivíduo era diabético.

A percentagem de indivíduos do grupo CTR e PAT que estão medicados é idêntica no que respeita a controlo do ritmo cardíaco (beta bloqueadores) e anti-hipercolesterémicos (estatinas). No entanto a percentagem de indivíduos do grupo controlo que se encontra medicado com anti-agregantes plaquetários (aspirina) é inferior, relativamente ao grupo de doentes (Tabela 3).

Dos indivíduos do grupo controlo que foram submetidos a tonometria arterial periférica, 45 % apresentaram disfunção. Relativamente à prova de esforço, 3 indivíduos do grupo CTR tiveram um resultado positivo. No grupo PAT apenas foi possível obter informação para este último parâmetro num indivíduo.

**Tabela 3.** Caracterização dos grupos de estudo\_ CTR e PAT

GRUPOS EM ESTUDO	CTR n=47	PAT n=12
<b>Dados demográficos</b>		
Sexo (f/m)	19/28	2/9
Idade	59±10	60±12
<b>Dados fisiológicos</b>		
Peso	72±14	76±9
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	26±4	27±5
Tensão arterial Sistólica (mm Hg)	131±14	139±32
Tensão arterial Distólica (mm Hg)	78±10	74±19
Frequência cardíaca (bpm)	78±15	77±14
Tonometria arterial periférica (n (%))	18 (45)	-
Prova de esforço	3(7)	1(n.a)
<b>Factores de Risco</b>		
Hábitos tabágicos (n (%))	4 (9)	3 (27)
Diabetes (n (%))	0 (0)	0 (0)
Hipertensão (n (%))	19 (40)	7 (64)
Dislipidémia (n (%))	12 (26)	1 (9)
CAD (n (%))	3(6)	1(9)
AVC (n (%))	0 (0)	1 (9)
EAM (n (%))	0 (0)	1 (9)
<b>Medicação prévia</b>		
Aspirina (n(%))	2 (4)	4 (36)
Beta bloqueadores (n(%))	3 (6)	1 (9)
Estatinas (n(%))	11 (23)	4 (36)

Valores expressos em média ± desvio padrão, excepto os indicados\_ n (%): n indivíduos (percentagem relativa ao total de indivíduos avaliados);\* p<0,05 ; n.a. não aplicável

No que respeita à caracterização biológica e bioquímica dos grupos (Tabela 4) observou-se o aumento significativo do número de neutrófilos e linfócitos no grupo PAT. No grupo PAT verificou-se também que as concentrações de troponina (marcador de lesão do miocárdio/função cardíaca), do péptido NT-proBNP (marcador de função ventricular) e de CRP (marcador de inflamação) estão significativamente elevadas. Os dois grupos não puderam ser comparados relativamente às concentrações de glicose, HDL, LDL, triglicéridos e colesterol total, dado que nos doentes a recolha de sangue não foi feita em jejum.

Analisando os dois grupos conjuntamente, verificou-se que existe uma correlação significativa entre a troponina e o NT-proBNP ( $\rho=0,491$ ;  $p<0,01$ ). Considerando os dois grupos separadamente, obteve-se uma correlação significativa entre a CRP e o NT-proBNP ( $\rho=0,762$ ,  $p<0,05$ ) no grupo PAT.

**Tabela 4.** Perfil Biológico e Bioquímico dos grupos de estudo \_CTR e PAT

GRUPOS EM ESTUDO	CTR	PAT
<b>Perfil Biológico</b>		
Leucócitos (x10 <sup>3</sup> /μl)	6±2	8±4
Neutrófilos (x10 <sup>3</sup> /μl)	4±1	12±19*
Linfócitos (x10 <sup>3</sup> /μl)	2±0,5	4±7*
Monócitos (x10 <sup>3</sup> /μl)	0,5±0,2	1±2
<b>Perfil Bioquímico</b>		
Colesterol total (mg/dl)	217±36	178±32
LDL-C (mg/dl)	145±36	122±30
HDL-C (mg/dl)	49±13	32±12
Triglicéridos (mg/dl)	103±53	146±68
Glicose (mg/dl)	97±30	112±26
Troponina (mg/dl)	0,01±0,01	0,5±0,7*
NT-proBNP (pg/ml)	51±49	2333±4657*
CRP (mg/dl)	0,5±1	2±3*

Valores expressos em média ± desvio padrão, excepto os indicados\_ n (%): n indivíduos (percentagem relativa ao total de indivíduos avaliados); \* p<0,05

#### 4.2. Lipoproteínas de baixa densidade oxidadas (ox-LDL)

Neste trabalho, a determinação de ox-LDL nas 57 amostras recolhidas nos grupos CTR e PAT foi efectuada em dois ensaios com recurso a dois *kits* ELISA. Como referido anteriormente, foram utilizados dois controlos *High* (H) e *Low* (L)), para validação do método, cada um com um intervalo específico de concentração. Aquando da realização do primeiro *kit* foi determinado um valor de 13,43 mU/l para o controlo H e 6,41 mU/l para o controlo L, valores estes dentro do intervalo recomendado para dois padrões (7,6-18,7 mU/ e 2,7-8,5 mU/l respectivamente). Quando foi feito o segundo kit, o valor obtido para o controlo H (19,87 mU/l) excedeu ligeiramente o valor máximo do intervalo recomendado (10-19 mU/l) e o valor obtido para o controlo L foi de 6,75 mU/l, encontrando-se dentro do intervalo de concentrações indicado pelo fabricante (4,6-7,7 mU/l).

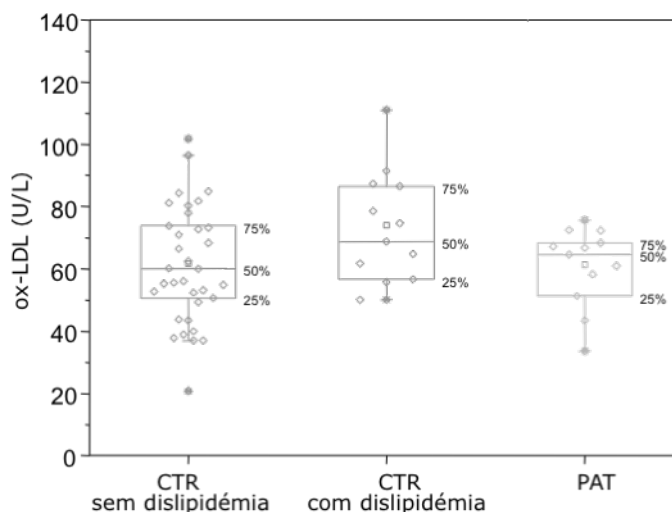
Os resultados obtidos para as concentrações plasmáticas de ox-LDL nos grupos de estudo, encontram-se resumidos na Tabela 5.

**Tabela 5.** Concentrações de ox-LDL nos grupos CTR e PAT

		CTR n=45	PAT n=12
ox-LDL (U/l)	Média ± desvio padrão	65 ± 19	61 ± 13
	Mínimo - Máximo	21 - 111	34 -75
	Intervalo de confiança 95%	59-71	53-69

Não se verificaram diferenças significativas entre os dois grupos, CTR e PAT como se pode inferir pelos intervalos de confiança do valor médio a 95% indicados na Tabela 5.

Foi avaliada a influência de factores de risco na variabilidade da ox-LDL. Verificou-se que os indivíduos do grupo CTR com dislipidémia apresentavam uma maior concentração de ox-LDL relativamente aos indivíduos controlo sem dislipidémia e aos indivíduos do grupo PAT (Gráfico 1) e que estas diferenças eram marginalmente significativas ( $p=0.055$  e  $p=0.056$ ).



**Gráfico 1.** Concentração de ox-LDL nos indivíduos com e sem dislipidémia do grupo CTR e no grupo PAT

Considerando todos os indivíduos estudados (grupo CTR e PAT) verificou-se também uma correlação significativa entre a ox-LDL e a dislipidémia ( $\rho=0,287$ ,  $p=0,03$ ). A correlação significativa entre a ox-LDL e a dislipidémia manteve-se, para o grupo CTR quando analisado individualmente ( $\rho=0,294$ ,  $p=0,05$ ). Relativamente aos restantes factores de risco, hipertensão e hábitos tabágicos, não foram encontradas correlações significativas com a ox-LDL.

### 4.3. Linfócitos

A análise das subpopulações linfocitárias  $CD3^+$  caracterizadas por citometria de fluxo encontram-se resumidas na Tabela 6. O número de linfócitos T  $CD4^+$  e  $CD8^+$  foi expresso em percentagem de linfócitos T  $CD3^+$ .

Observou-se uma diminuição do número de linfócitos  $CD4^+$  e um aumento do número de  $CD8^+$  no grupo PAT relativamente ao grupo CTR. Estas variações foram ambas significativas ( $p<0.05$ ). As variações percentuais de linfócitos  $CD4^+$  e  $CD8^+$  observadas no grupo PAT foram proporcionais tendo como referência os valores obtidos no grupo controlo. Ou seja, a percentagem de linfócitos  $CD3^+$  mantém-se nos dois grupos (ver Tabela 6) e o aumento de linfócitos  $CD8^+$  foi compensado pelo decréscimo dos linfócitos  $CD4^+$ .

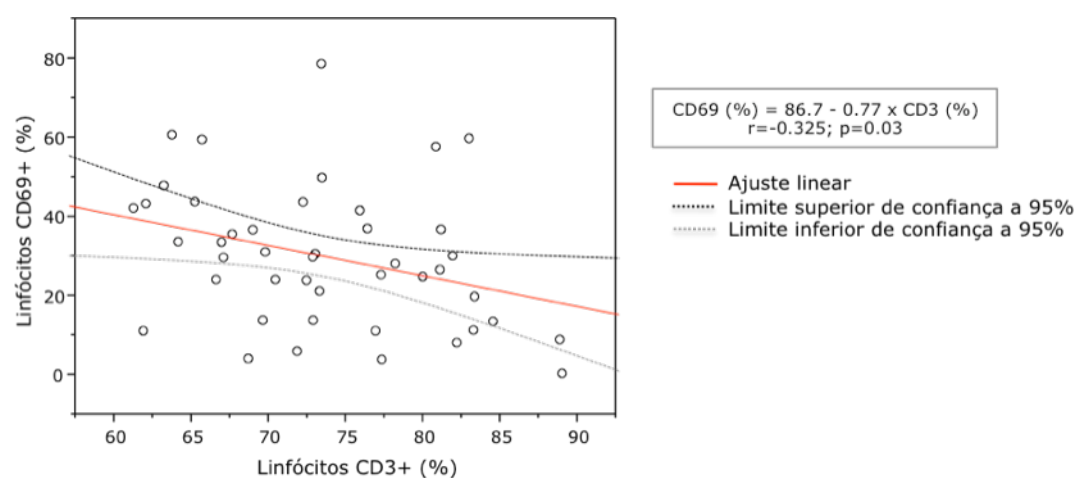
Os resultados obtidos para os linfócitos activados que expressavam CD69<sup>+</sup> caracterizou-se por uma grande variabilidade nos dois grupos de estudo, como pode ser inferido pelos dados apresentados na Tabela 6. Não se verificaram diferenças significativas na percentagem de linfócitos activados (positivos para CD69) entre os grupos CTR e PAT.

**Tabela 6 .** Dados de citometria dos linfócitos T de ambos os grupos em estudo

GRUPOS EM ESTUDO	CTR	PAT
<b>Linfócitos T</b>		
%CD3	72±9	73±10
%CD4	76±11	66±12*
%CD8	19±8	28±10*
<b>Activação Linfócitos T</b>		
%CD69	30±15	20±22

Valores expressos em média ± desvio padrão; \* p<0,05

Os linfócitos CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> encontram-se correlacionados ( $\rho=-0,962$ ,  $p<0,001$ ), quer no grupo CTR quer no grupo PAT. Também se verificou uma correlação inversa entre os linfócitos CD3<sup>+</sup> e os linfócitos activados CD69<sup>+</sup> ( $\rho=-0,293$ ,  $p=0,02$ ) no grupo CTR (Gráfico 2), que não se observou no grupo PAT.



**Gráfico 2.** Relação entre os linfócitos CD3 e CD69 no grupo CTR. O ajuste linear foi significativo ( $CD69 (\%) = 86.7 - 0.77 \times CD3 (\%)$ ;  $r=-0.325$ ;  $p=0.03$ ) e está representado pela linha a vermelho. Linhas a tracejado - bandas de confiança a 95%.

#### 4.4. ox-LDL e Linfócitos

Não se verificaram associações entre as concentrações de ox-LDL no plasma e o numero de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> e linfócitos activados CD69<sup>+</sup>.

## 4.5. Factor Nuclear kappa B

### 4.5.1. Quantificação da proteína

A quantificação da proteína é um passo muito importante no *Western Blotting*, de forma a aplicar idênticas quantidades de proteína das diferentes amostras e de modo a poder comparar os resultados obtidos.

Resultados obtidos de *Westerns* anteriores (não apresentados) indicavam problemas com o fraccionamento e com a quantificação da proteína. Detectou-se  $\alpha$ -tubulina nos núcleos e um padrão de bandas variável nas diferentes amostras. Se o fraccionamento tivesse sido bem feito, não se teria detectado  $\alpha$ -tubulina nos núcleos e teríamos um padrão de bandas semelhante em todas as amostras do mesmo tipo. Por este motivo, para além de extractos citoplasmáticos e nucleares resultantes de fraccionamento celular, armazenaram-se também alíquotas de extractos totais (obtidos antes do fraccionamento) de algumas amostras. Um dos objectivos de guardar amostras dos extractos totais foi avaliar se havia ou não perdas de proteína aquando do fraccionamento celular. O outro objectivo era ter a possibilidade de poder comparar as quantidades das proteínas a detectar, sem a influência de possíveis deficiências no fraccionamento celular.

Nas tabela 7 estão discriminadas as quantidades de proteína das amostras utilizadas nos *Westerns* A, B e C (ver secção 4.5.2, tabela 9) e na tabela 8 as razões entre os valores obtidos de quantidade de proteína, relativamente a extractos citoplasmáticos e nucleares, à soma destes dois tipos de extractos e extractos totais ou a extractos citoplasmáticos e extractos totais, nas situações em que não havia extractos nucleares.

**Tabela 7.** Quantificação de proteína dos extractos citoplasmáticos, nucleares e totais

amostra	Extractos Citoplasmáticos			Extractos nucleares			Extractos Totais		Condições de processamento das amostras
	[proteína] $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	Volume final	proteína total ( $\mu\text{g}$ )	[proteína] $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	Volume final	proteína total ( $\mu\text{g}$ )	[proteína] $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	proteína total ( $\mu\text{g}$ )	
CAD132a	3,5	50	175	2,0	20	40	-	-	1
CAD136a	3,6	50	180	1,6	20	32	-	-	1
CAD138a	4,0	50	200	1,4	20	28	-	-	1
CAD143a	2,3	50	115	1,5	20	30	2,5	900	1
CAD144a	2,4	50	120	0,9	20	18	1,4	504	1
CAD158a	4,6	50	230	1,2	20	24	3,0	1080	1
CAD155a	2,3	50	115	-	-	-	2,2	792	2
CAD156a	3,5	50	175	-	-	-	1,4	504	2
CAD113c	5,4	50	270	0,6	20	12	-	-	3
CAD115c	5,3	50	265	2,2	20	44	-	-	3
CAD162a	3,1	50	155	4,0	20	80	3,9	1404	3
CAD146a	4,2	50	210	-	-	-	2,2	792	4
CAD157b	6,1	50	305	-	-	-	3,6	1296	4

**Legenda:** proteína total (extractos citoplasmáticos e nucleares): concentração da proteína x volume final de extracto; proteína total (extractos totais): concentração da proteína x 360\*; condições: 1) **CTR** em que a separação de CMNs e o fraccionamento celular foram feitos no dia de recolha; 2) **CTR** em que a separação de CMNs foi feita no dia de recolha e o fraccionamento celular no dia seguinte; 3) **PAT** em que a separação e o fraccionamento celular foram feitos no dia de recolha; 4) **PAT** em que a separação das CMNs foi feita no dia de recolha e o fraccionamento celular no dia seguinte. \* Porque foram sujeitos a fraccionamento celular 360  $\mu\text{l}$  de CMNs totais, e no final desse fraccionamento resultaram os volumes de fracções citoplasmáticas e nucleares indicados na tabela.



Os valores variam entre os 115 e os 305 µg de proteína nos extractos citoplasmáticos, com uma média de 193,46 µg. Embora o número de amostras seja reduzido, verificou-se que o intervalo de valores de proteína dos extractos citoplasmático é elevado, com um desvio padrão de 61,3. Esta grande variabilidade de valores poderá reflectir um desigual processamento e fraccionamento das amostras.

Relativamente aos extractos nucleares os valores variam entre 12,0 e 80,0 µg de proteína, com uma média de 34,22 (desvio padrão de 19,8). Em conformidade com os resultados das concentrações de proteína dos extractos citoplasmáticos, no caso das concentrações dos extractos nucleares, também se verificou uma grande variabilidade de valores.

Comparando os extractos (tabela 8) verificou-se que a razão proteína do extracto nuclear / proteína do extracto citoplasmático difere muito entre amostras, tendo um mínimo de 4,4 % e um máximo de 51,6 %. Analisando as condições de processamento das amostras 1, 2, 3 e 4 verificou-se que dentro do grupo 1 esta razão tem um intervalo de valores mais pequeno e que as grandes diferenças se verificaram no grupo 3.

**Tabela 8.** Comparação entre as quantidades de proteína presentes em extractos citoplasmáticos, nucleares e totais, para cada uma das amostras, e relativamente ao mesmo número de CMNs.

amostra	extracto nuclear / extracto citoplasmático	(extracto nuclear + extracto citoplasmático) /extracto total	Perda de proteína no fraccionamento (%)	Condições de processamento das amostras
CAD132a	0,23	-	-	1
CAD136a	0,18	-	-	1
CAD138a	0,14	-	-	1
CAD143a	0,26	0,16	84%	1
CAD144a	0,15	0,27	73%	1
CAD158a	0,10	0,24	77%	1
CAD155a	-	0,15*	-	2
CAD156a	-	0,35*	-	2
CAD113c	0,044	-	-	3
CAD115c	0,17	-	-	3
CAD162a	0,52	0,17	83%	3
CAD146a	-	0,27*	-	4
CAD157b	-	0,24*	-	4

**Legenda:** \* razão extracto citoplasmático / extracto total, dada a inexistência do correspondente extracto nuclear; perda proteína: 1 – (extractos nucleares + extractos citoplasmático / extractos totais ) x 100; **condições:** 1) **CTR** em que a separação de CMNs e o fraccionamento celular foram feitos no dia de recolha; 2) **CTR** em que a separação de CMNs foi feita no dia de recolha e o fraccionamento celular no dia seguinte; 3) **PAT** em que a separação e o fraccionamento celular foram feitos no dia de recolha; 4) **PAT** em que a separação das CMNs foi feita no dia de recolha e o fraccionamento celular no dia seguinte.

Com a decisão de guardar também os extractos totais, pretendeu-se verificar as perdas de proteína durante o processo de fraccionamento. Verificou-se que houve perdas de proteína e que esta foi muito elevada, estando na ordem dos 80%.

#### 4.5.2. Optimização do método *Western Blotting*

No total foram processadas 31 amostras, no entanto, verificaram-se erros no processamento de algumas e por isso mesmo foi feita uma selecção final de 13 amostras, 8 amostras de controlos e 5 de doentes. A selecção destas amostras foi também feita com base no tipo de extractos que se tinham obtido (totais, citoplasmáticos e nucleares).

Dentro destas amostras temos controlos cuja separação das fracções citoplasmáticas e nucleares foram feitas no dia de recolha (CTR dia) e outras em que a banda de CMNs foi armazenada até ao dia seguinte, dia em que foi feita a separação das fracções (CTR dia seguinte). Relativamente às amostras dos doentes, temos também os dois tipos de situação.

Com estas amostras foram feitos 3 *Westerns* distintos A, B e C de modo a avaliar diversos tipos de diferenças entre as várias amostras. O *Western A* foi realizado de modo a avaliar se ocorreram alterações nas amostras devido ao armazenamento da banda de CMNs após separação com o Lympholyte®-H, o *Western B* para avaliar se durante o fraccionamento ocorrem perdas e/ou degradação de proteína e o *Western C* para avaliar diferenças entre os dois grupos em estudo, CTR e PAT. Na tabela 9 estão indicadas as amostras utilizadas nos três *Westerns*. Nestes testes pretendeu-se aplicar a mesma quantidade de proteína (2,5 µg) ) para as diferentes amostras, tendo sido feitas diluições adequadas em tampão de amostra NuPAGE® 1x, de modo a também se aplicar o mesmo volume em cada poço do gel (Tabela 1).

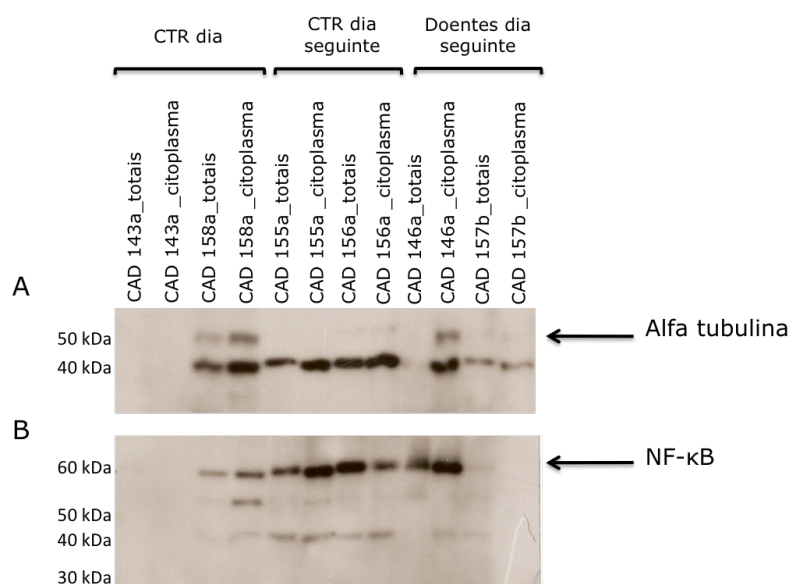
Foram utilizados dois anticorpos, como já foi referido, um para a detecção da subunidade p65 do factor de transcrição NF-κB e outro para a α-tubulina como controlo do fraccionamento e da integridade da amostra e também como controlo do método *Western blotting*, uma vez que esta proteína é exclusivamente citoplasmática e deverá estar presente em quantidades idênticas, em extractos com a mesma quantidade de proteína.

**Tabela 9.** Listagem das amostras utilizadas nos *Western blots* A, B e C

Amostras	Tipo	Western A	Western B	Western C
CAD132a	CTR dia			Extractos citoplasmáticos e Extractos nucleares
CAD136a	CTR dia			Extractos citoplasmáticos e Extractos nucleares
CAD138a	CTR dia			Extractos citoplasmáticos e Extractos nucleares
CAD143a	CTR dia	Extractos citoplasmáticos e Extractos totais	Extractos citoplasmáticos, Extractos nucleares e Extractos totais	
CAD144a	CTR dia		Extractos citoplasmáticos, Extractos nucleares e Extractos totais	
CAD158a	CTR dia	Extractos citoplasmáticos e Extractos totais	Extractos citoplasmáticos, Extractos nucleares e Extractos totais	
CAD155a	CTR dia seguinte	Extractos citoplasmáticos e Extractos totais		
CAD156a	CTR dia seguinte	Extractos citoplasmáticos e Extractos totais		
CAD113c	PAT dia			Extractos citoplasmáticos e Extractos nucleares
CAD115c	PAT dia			Extractos citoplasmáticos e Extractos nucleares
CAD162a	PAT dia		Extractos citoplasmáticos, Extractos nucleares e Extractos totais	
CAD146a	PAT dia seguinte	Extractos citoplasmáticos e Extractos totais		
CAD157b	PAT dia seguinte	Extractos citoplasmáticos e Extractos totais		

#### 4.5.2.1. Armazenamento da amostra após separação das CMNs

Para avaliar se ocorreram alterações nas amostras, como por exemplo degradação de proteína devido ao armazenamento da banda de células após separação com o Lympholyte®-H , fez-se um teste com dois tipos de amostras, umas em que todo o procedimento (separação das CMNs e de fracções) foi feito no dia de recolha e outras em que se deixou a banda para o dia seguinte (**Western A**). Para tal utilizaram-se extractos totais e citoplasmáticos de 6 amostras, 2 CTR do dia, 2 CTR do dia seguinte e 2 PAT do dia seguinte (ver tabela 9).



**Figura 8.** Teste A: Expressão da  $\alpha$ -tubulina (A) e do NF- $\kappa$ B (B) em extractos citoplasmáticos e nucleares de CMNs; Expressão avaliada por *Western Blotting*, exposição de 15 segundos, seguida de revelação de 1 minuto.

Relativamente à  $\alpha$ -tubulina, existem diferenças entre as amostras processadas no dia de recolha e aquelas em que se deixou a banda de células para o dia seguinte (Figura 8). Nas amostras do dia seguinte, não se detectou a banda de maior massa molecular da  $\alpha$ -tubulina à excepção do extracto citoplasmático do CAD146a. Por outro lado, existe uma segunda banda de menor massa molecular em quase todas as amostras, detectada pelo anticorpo da  $\alpha$ -tubulina que poderá ser um produto de degradação desta proteína. Se assim for, verificou-se que há expressão em quase todas as amostras, com excepção do CAD143a. Verificou-se também, no caso das amostras do dia seguinte, a presença de uma só banda da  $\alpha$ -tubulina, a de menor massa molecular. Esta banda de menor massa molecular tem uma maior expressão nas amostras do dia seguinte.

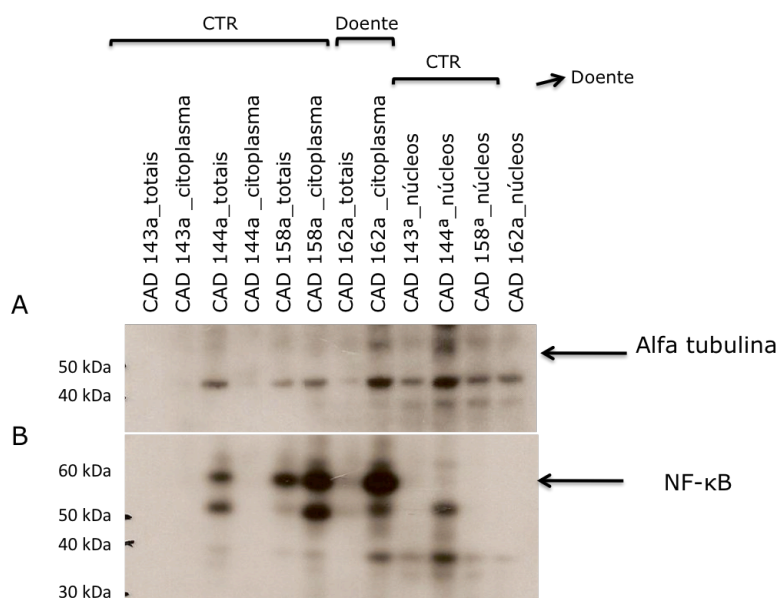
Relativamente ao NF- $\kappa$ B, foi detectada expressão tanto nas amostras do dia como nas do dia seguinte (Figura 8). A banda do NF- $\kappa$ B (65 kDa) foi bem visível em quase todas as amostras, excepto em todas as fracções da amostra CAD143a (CTR dia) e no extracto citoplasmático do CAD157b (PAT dia seguinte). Também com este anticorpo são detectadas outras bandas, que parecem ser produtos inespecíficos e/ou de degradação. Muito provavelmente corresponderão a detecção inespecífica por este anticorpo, uma vez que correspondiam às bandas de maior intensidade que se visualizaram quando se corou os *blots* com azul de Coomassie, após a detecção com os anticorpos (resultados não apresentados). A banda correspondente ao NF- $\kappa$ B não se visualizava, como esperado para uma proteína minoritária na amostra aplicada.

No caso do CAD143a, que é um CTR do dia, este não apresentou qualquer expressão nem nos extractos de CMNs totais nem nos extractos citoplasmáticos para qualquer um dos anticorpos.

#### 4.5.2.2. Separação de fracções celulares: perda e/ou degradação da proteína e contaminação de extractos

De modo a avaliar se durante a separação dos extractos ocorrem perdas e/ou degradação de proteína durante o fraccionamento, fez-se um ensaio com amostras em que todo o procedimento, separação das CMNs e extracções, foi feito no dia de recolha de sangue (**Western B**). Estudou-se a perda e a degradação de proteína assim como a contaminação da fracção nuclear, baseada na presença de expressão da  $\alpha$ -tubulina nos extractos nucleares. Para tal utilizaram-se extractos totais, citoplasmáticos e nucleares de 4 amostras, 3 CTR e 1 PAT (Tabela 9).

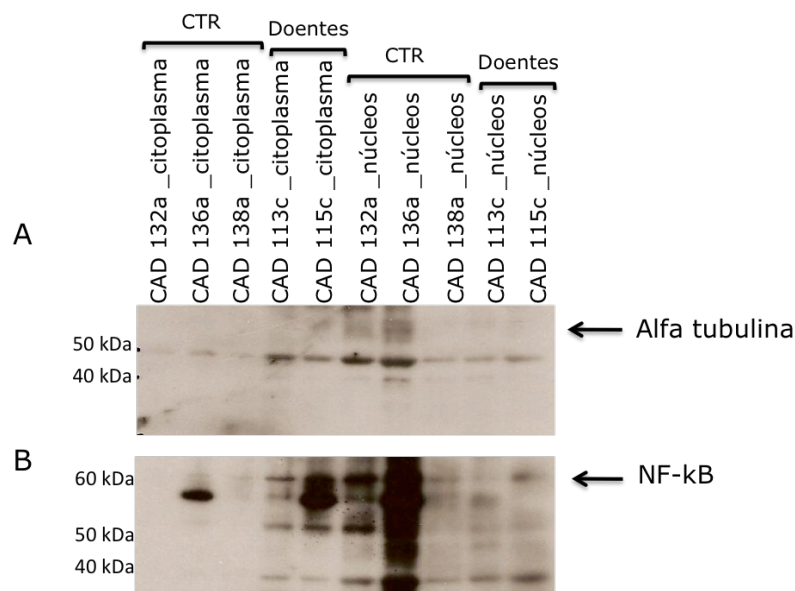
Neste estudo foram também examinadas as diferenças entre os dois grupos de estudo, CTR e os PAT. Fez-se um teste com amostras em que todo o procedimento foi feito no dia de recolha (**Western C**). Para tal utilizaram-se extractos citoplasmáticos e nucleares de 5 amostras, 3 CTR e 2 PAT (Tabela 9).



**Figura 9.** Teste B: Expressão da  $\alpha$ -tubulina (A) e do NF- $\kappa$ B (B) em extractos totais e em extractos citoplasmáticos e nucleares; Expressão avaliada por *Western Blotting*, exposição de 30 segundos, seguida de revelação de 1 minuto. As membranas foram incubadas *overnight* com o anticorpo para a subunidade p65 do NF- $\kappa$ B e as da  $\alpha$ -tubulina de acordo com o protocolo.

Nestes teste verificou-se, considerando as duas bandas relativas à  $\alpha$ -tubulina (55 kDa e  $\approx$ 45kDa), a presença de  $\alpha$ -tubulina na maior parte das amostras, mas com pouca intensidade, à excepção do extracto nuclear do CAD144a e do extracto citoplasmático do CAD162a. Na amostra CAD143a, não se observou expressão da  $\alpha$ -tubulina nos extractos total e citoplasmático, no entanto, verificou-se uma pequena expressão no extracto nuclear. Também a amostra CAD144a não apresentou expressão no extracto citoplasmático (ver Figura 9).

Relativamente ao NF- $\kappa$ B, não se observou expressão significativa quer no extracto nuclear do controlo CAD158 como no do doente CAD162a. Tanto os extractos citoplasmáticos como os extractos totais apresentaram expressão do NF- $\kappa$ B nestes dois indivíduos. Também no extracto citoplasmático da amostra CAD144a não se observou expressão do NF- $\kappa$ B (ver Figura 9).



**Figura 10.** Teste C: Expressão da  $\alpha$ -tubulina (A) e do NF- $\kappa$ B (B) em extractos citoplasmáticos e nucleares de CMNs; Expressão avaliada por *Western Blotting*, exposição de 30 segundos, seguida de revelação de 1 minuto. As membranas foram incubadas *overnight* com o anticorpo para a subunidade p65 do NF- $\kappa$ B e as da  $\alpha$ -tubulina de acordo com o protocolo.

Os resultados obtidos para o teste C (comparação dos grupos CTR e PAT) estão representados na Figura 10. Relativamente à  $\alpha$ -tubulina e avaliando as duas bandas, verificou-se que existe expressão em todas as amostras. Os extractos citoplasmáticos dos indivíduos CTR apresentaram uma expressão menor, no entanto, a expressão nos extractos nucleares é um pouco mais elevada, à excepção do CAD138a que tem uma expressão reduzida em ambas as amostras. Relativamente às amostras do grupo PAT (CAD113c e 115c) observou-se o contrário, os extractos citoplasmáticos apresentaram uma expressão mais elevada do que os extractos nucleares.

Relativamente ao NF- $\kappa$ B observaram-se variações na expressão desta proteína. No caso dos doentes houve expressão nos dois tipos extractos, sendo que os extractos citoplasmáticos têm uma expressão mais elevada do que os extractos nucleares. Nos CTR, a expressão nos extractos citoplasmáticos é muito reduzida. A expressão nos extractos nucleares é elevada para o CAD136a e para o CAD132a, tendo o CAD138a uma expressão mais reduzida.

#### **4.5.3. Ox-LDL e NF- $\kappa$ B**

Um dos objectivos desta tese de mestrado era relacionar as concentrações plasmáticas de ox-LDL com a expressão do NF- $\kappa$ B com particular ênfase na doença coronária.

No entanto, até à data de conclusão desta tese, não se obtiveram resultados consistentes e conclusivos para a expressão do NF- $\kappa$ B nas CMNs totais e nos extractos celulares não se podendo por isso inferir relações do NF- $\kappa$ B com os outros parâmetros estudados (ox-LDL e linfócitos T).

## 5. Discussão

---

Embora os avanços na medicina tenham sido significativos nos últimos anos, muitos dos mecanismos das doenças continuam por clarificar. A aterosclerose está na base das doenças cardiovasculares, e estas associadas a uma elevada taxa de morbilidade e mortalidade a nível mundial. Ao longo dos tempos, muita investigação foi feita à volta da etiologia da aterosclerose e das suas manifestações clínicas, no entanto, o processo inflamatório e a ruptura da placa são aspectos ainda longe de estarem totalmente clarificados.

Muitos dos estudos realizados foram efectuados utilizando modelos *in vitro*. No entanto, a transposição dos resultados obtidos *in vitro* para *in vivo* não é directa, e nem sempre os mecanismos verificados *in vitro* são verificados *in vivo*.

O objectivo principal do presente trabalho, foi o de estabelecer uma relação entre os níveis de ox-LDL no plasma e a activação da via de transcrição do NF-κB nas células mononucleadas do sangue periférico (CMNs), utilizando como modelo de estudo, indivíduos com doença coronária e indivíduos saudáveis como grupo controlo. Neste contexto, foi relevante estudar a relação entre as populações linfocitárias, assim como a activação linfocitária e os níveis de ox-LDL, para além de estabelecer metodologias que permitissem avaliar a via de sinalização do NF-κB *in vivo*, a partir do sangue periférico.

Dadas as características do estudo tornou-se necessário proceder a uma caracterização rigorosa dos indivíduos controlo e dos doentes. Foram para o efeito utilizadas novas metodologias de caracterização da função endotelial, como a tonometria arterial periférica e submeteram-se todos os voluntários do grupo controlo a provas de esforço com ecocardiograma, além da recolha de dados fisiológicos e clínicos. Também os dados bioquímicos recolhidos tiveram em atenção marcadores da função cardíaca, ventricular e indicadores de inflamação.

No decorrer deste trabalho, a constituição dos grupos de estudo foi irregular. Enquanto que no grupo controlo foram incluídos 47 indivíduos, no grupo com patologia, apenas foram seleccionados 12 doentes com doença coronária confirmada e sujeitos a angioplastia. No que respeita à avaliação de parâmetros clínicos, fisiológicos e bioquímicos, incluindo ox-LDL e linfócitos, a dimensão do grupo PAT limitou uma avaliação estatística mais aprofundada. No entanto, foram verificadas alterações e associações que se encontram descritas na literatura para grupos maiores de doentes. Neste estudo, verificou-se que a proteína C-reactiva (CRP), troponina e NT-proBNP se encontravam mais elevados nos doentes, o que está de acordo com o descrito na literatura.

A CRP é uma proteína de fase aguda, sendo um marcador inflamatório que poderá desempenhar um papel no desenvolvimento e progressão da aterosclerose. Tem afinidade para as LDL e LDL oxidadas e poderá actuar como quimioattractante e estar envolvido na expressão de moléculas de adesão. Esta proteína está normalmente elevada em doentes, particularmente em doentes com angina instável, reflectindo a presença de inflamação<sup>1, 2,</sup>



Por lesão do miocárdio, a troponina é libertada verificando-se a sua elevação na corrente sanguínea, sendo por isso um importante marcador de lesão do músculo cardíaco. A troponina é constituída por três subunidades (I, T e C), sendo a troponina T o componente mais importante do sarcómero do músculo do miocárdio, está localizado no filamento de actina conjuntamente com a tropomiosina e está envolvida na regulação da contracção do músculo cardíaco mediada pelo cálcio<sup>75</sup>. Além de estar presente no sarcómero, está também livre no citoplasma. Aquando de danos no músculo cardíaco, a troponina livre no citoplasma é libertada para a corrente sanguínea<sup>1</sup>. Após a ruptura da placa aterosclerótica numa das artérias coronárias e a formação do trombo o fluxo sanguíneo fica comprometido nos tecidos irrigados em particular a região do ventrículo direito. São também libertadas citocinas e hormonas, como é o caso do péptido natriurético de tipo B (BNP) co-libertado com o fragmento N-terminal proBNP (NT-proBNP). O BNP é uma neuro-hormona cardíaca sintetizada nos ventrículos, libertada em estados de falência ventricular e que tem um efeito de vasodilatação e de aumento da natriurese<sup>76</sup>. Quer o BNP como o péptido N-terminal proBNP (NT-proBNP) são utilizados como marcadores de função ventricular.

O grupo controlo foi constituído de forma aleatória, contendo por isso factores de risco, tais como hipertensão, dislipidémia e hábitos tabágicos. No que respeita ao grupo PAT, embora todos os factores de risco estivessem presentes, a pequena dimensão do grupo não permitiu uma análise estatística aprofundada para avaliação da influência destes factores, nos indicadores medidos. Apenas o número de indivíduos com hipertensão foi expressivo (mais de metade dos doentes eram hipertensos). Também é de salientar que apesar de se ter verificado uma maior percentagem de indivíduos com hipertensão no grupo PAT, os valores de tensão arterial diastólica e sistólica registados nos dois grupos estudados encontravam-se dentro dos limites considerados normais (90 mmHg e 140 mmHg, respectivamente). Estes valores da tensão arterial, dentro dos limites de referência, poderão estar encobertos pelo efeito da medicação a que estes doentes estão sujeitos.

No que respeita à dislipidémia, verificou-se uma incidência significativa no grupo CTR, que se associava a níveis elevados de ox-LDL no plasma. No entanto, não foram observadas diferenças significativas na concentração de ox-LDL entre os indivíduos do grupo controlo e doentes, mesmo quando apenas foram considerados os indivíduos do grupo CTR sem dislipidémia. Estes resultados sugerem que os níveis de ox-LDL no plasma estão particularmente associados à disfunção lipídica. No entanto tem de se ter em conta que a maior parte dos doentes se encontravam medicados, ao contrário do grupo controlo.

A hipercolesterémia ou dislipidémia tem sido associada, entre outras lipoproteínas, ao aumento das LDL que são as maiores lipoproteínas transportadoras de colesterol<sup>20</sup> e um importante alvo de oxidação<sup>5</sup>. Vários estudos demonstraram uma relação entre os níveis de ox-LDL no plasma no enfarte agudo do miocárdio e angina instável sendo, que os níveis de ox-LDL são mais elevados em doentes do que em indivíduos sem doença<sup>9, 18, 20, 21</sup>.

No que respeita à influência da medicação estudos e ensaios clínicos demonstraram que as estatinas diminuem os níveis plasmáticos de colesterol e de LDL<sup>77</sup>.

Desta forma a medicação poderá também influenciar os níveis de ox-LDL. De facto, 36% dos doentes e 11% dos indivíduos do controlos estavam medicados com estatinas. Por conseguinte, os níveis baixos de ox-LDL observados nos doentes sugerem a influência benéfica deste tipo de medicação nos níveis de ox-LDL.

Verificou-se a existência de uma correlação entre os linfócitos CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> e entre os linfócitos CD3<sup>+</sup> e CD69<sup>+</sup>. Verifica-se que há um aumento dos linfócitos CD8<sup>+</sup> e uma diminuição dos linfócitos CD4<sup>+</sup> nos doentes relativamente ao grupo controlo, havendo uma diminuição do ratio CD4/CD8. Esta diminuição do ratio dos linfócitos T CD4/CD8 encontra-se descrita nas doenças cardiovasculares, nomeadamente no enfarte agudo do miocárdio<sup>78</sup>. Em particular, o aumento dos linfócitos CD8<sup>+</sup> ou citotóxicos poderá estar relacionado com a remodelação dos tecido danificado após o evento agudo (enfarte do miocárdio ou angina instável). Por sua vez a activação linfocitária pode ter um duplo papel, no controlo da inflamação e na sua propagação. Estudos demonstraram um aumento do marcador de activação CD69 em linfócitos de pacientes com enfarte do miocárdio<sup>79</sup>. Neste trabalho, os níveis de activação linfocitária não foram conclusivos. O indicador CD69<sup>+</sup> revelou ter uma expressão reduzida e uma grande variabilidade. Esta variabilidade resultou em parte de limitações analíticas, uma vez que dada a pequena expressão de CD69<sup>+</sup> nos linfócitos o erro de determinação da fluorescência média, por citometria de fluxo para este parâmetro, foi significativamente maior.

No que diz respeito à detecção do NF-κB nas células mononucleadas do sangue periférico surgiram várias dificuldades de carácter metodológico. A separação dos extractos celulares não foi eficaz o que conduziu a perdas muito grandes de proteína e também à contaminação dos extractos nucleares com proteínas citoplasmáticas.

A ideia inicial era utilizar dois anticorpos, um para a subunidade p65 do NF-κB e outro para o inibidor, o I-κB, que correlacionados poderiam permitir avaliar e quantificar a activação do factor de transcrição. O anticorpo escolhido para o IκB e sugerido pela empresa à qual comprámos os anticorpos, foi um anticorpo específico para o IκB fosforilado. Este reconhece os resíduos de serina fosforilados, resíduos estes que são fosforilados pelo IKK após estimulação/sinalização. A fosforilação dos resíduos de serina é o primeiro passo após estímulo que leva degradação do IκB e activação do NF-κB<sup>38, 40</sup>. No entanto, o IκB tem um *turnover* rápido, ou seja, logo após a fosforilação, ocorre poliubiquitinação das proteínas e degradação no proteossoma<sup>80</sup>, e deste modo não obtivemos resultados positivos (não apresentados). Desta forma adoptou-se por utilizar somente os anticorpos específicos para o NF-κB e para a α-tubulina.

Nos vários testes de optimização feitos verificou-se que o anticorpo para a subunidade do NF-κB reconhece muitas proteínas, verificando-se a presença de diversas bandas de diferentes massas moleculares. A α-tubulina parece ser facilmente degradada, verificando-se duas bandas distintas que são reconhecidas pelo anticorpo. A banda com massa molecular menor, parece ser um produto de degradação que nos indica que embora degradada, a α-tubulina está presente. De notar que uma imagem idêntica, embora com um banda ténue desta segunda proteína, é apresentada na bula fornecida com este anticorpo. Verifica-se que as amostras do dia seguinte têm maioritariamente só a banda

com menor massa molecular, o que nos indica, se esta banda for um produto de degradação, que há degradação de proteína nas amostras processadas no dia seguinte ao da recolha. Como foi referido anteriormente, segundo a informação dada pelo fabricante do anticorpo da  $\alpha$ -tubulina utilizada, esta banda observada é esperada, no entanto, não se espera que seja maioritária.

Verificou-se também que o fraccionamento celular não terá sido adequadamente efectuado, necessitando de ser optimizado visto que  $\alpha$ -tubulina, ao contrário do que foi observado de uma forma generalizada, nunca deveria ter sido detectada em extractos nucleares. Através dos resultados da quantificação da proteína reforça-se esta conclusão, tendo sido verificado uma perda significativa de proteína durante o fraccionamento relativamente ao total, cerca de 80% de perda.

Apesar das dificuldades referidas na separação de extractos celulares, tentou-se fazer uma avaliação preliminar das eventuais diferenças na expressão do NF- $\kappa$ B em doentes e em indivíduos do grupo controlo, tendo o cuidado de seleccionar amostras processadas nas mesmas condições. Seria de esperar encontrar  $\alpha$ -tubulina somente no citoplasma e com uma expressão semelhante, visto que as amostras foram tratadas da mesma forma e pretendeu-se aplicar uma quantidade igual de proteína para cada amostra (2,5 $\mu$ g). Relativamente ao NF- $\kappa$ B seria de esperar uma maior expressão nos extractos nucleares dos doentes, reflectindo um factor de transcrição activo e nos indivíduos controlos uma maior expressão nos extractos citoplasmáticos reflectindo inactivação. No entanto, os resultados obtidos não foram consistentes, mais uma vez evidenciando o fraccionamento celular deficiente.

Os dois pontos mais críticos neste trabalho são a separação das fracções, que se verificou não ser eficaz e a quantificação de proteína. Aparentemente houve erros na quantificação da proteína, isto porque foram feitos cálculos para aplicar a mesma quantidade de proteína de cada amostra e o que se verifica é que tal não aconteceu. Como referido anteriormente, a coloração dos *blots* com azul de Coomassie evidenciou este aspecto. O método de Lowry é um método de fácil execução, no entanto, não se descarta que possa ter havido erros na sua execução. Pode ter havido erros na pipetagem, embora as pipetas estivessem calibradas, e/ou uma má homogeneização das amostras retiradas para quantificação. Não se tendo obtido uma fracção representativa de algumas das amostras, o resultado foi uma quantificação de proteína nas amostras diferente da que foi armazenada para os *westerns*.

Por último, a revelação também foi problemática, embora as dificuldades fossem ultrapassáveis. Houve dificuldades relacionadas com a orientação dos géis e dos filmes, utilizando régua fluorescentes, que a partir de uma certa altura deixaram de impressionar os filmes apesar de terem sido iluminadas previamente mas que foi parcialmente solucionado cortando um dos cantos da membrana de *blotting*. No entanto, este procedimento nem sempre foi eficaz. Em alguns ensaios os limites da membrana nos filmes não eram visíveis, mesmo após várias revelações (com diferentes tempos de exposição).

## 6. Conclusões Finais e Perspectivas Futuras

---

O tempo em que decorre uma tese de mestrado é curto, e por vezes não há tempo para otimizar as técnicas que permitam ter resultados fiáveis. Houve algumas dificuldades no decurso do trabalho e optimização das técnicas e, embora tenhamos ultrapassado umas, outras ainda ficaram ainda em aberto.

Um dos aspectos que poderá ser ultrapassado em curto espaço de tempo é o estudo da activação linfocitária. Obter informação sobre a activação linfocitária *in vivo* é um aspecto muito relevante quer na caracterização das fases agudas da doença coronária, quer na evolução da doença. No entanto, apesar de serem conhecidas muitas moléculas relacionadas com a activação linfocitária, a sua aplicação clínica revela-se limitada, como se verificou com o indicador CD69 estudado e também com um outro indicador - CD49, testado no âmbito do projecto em que este trabalho se inseriu. Futuramente, poder-se-á testar o receptor da interleucina 2 (CD25) em associação com as subpopulações de linfócitos reguladores, no sentido de aprofundar a relevância dos linfócitos na doença coronária.

Penso que o factor tempo, foi decisivo nesta optimização. Um outro factor importante foi a amostra em si, e que também teve influência na optimização das técnicas. Por um lado, tratando-se de um estudo clínico, a quantidade disponível de amostra era limitada e pequena, não permitindo fazer réplicas ou por vezes repetir o processo. Por outro, o tratamento da amostra para separação das células mononucleadas e posterior obtenção dos extractos celulares obrigava a que todo o processamento fosse feito rapidamente num período curto de tempo, após o qual havia degradação das células e que impossibilitava a separação em gradiente de densidade. A separação dos extractos celulares não foi eficaz e mais uma vez teria sido necessário mais tempo para examinar o protocolo de separação em detalhe e tentar aperfeiçoar a metodologia.

Os *westerns* foram feitos com amostras processadas em condições diferentes. Numa situação ideal, e que provavelmente daria resultados mais consistentes de modo a cumprir o objectivo de relacionar o NF-kB com os outros parâmetros medidos (ox-LDL e linfócitos), seria realizar o western com amostras processadas de forma idêntica e com a mesma quantidade de proteína. Também teria sido interessante examinar a presença de NF-kB nas células mononucleadas por imunohistoquímica. No entanto, e como já referi, o tempo foi muito curto e não foi possível reunir todas as condições para o fazer. Este trabalho foi o início de um novo estudo e penso que com mais tempo para otimizar as técnicas, poderá dar bons resultados.

## 7. Referências bibliográficas

---

1. Scott J. Pathophysiology and biochemistry of cardiovascular disease. *Current Opinion in Genetics & Development* 2004;14(3):271-279.
2. Hansson GK. Mechanisms of disease - Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *New England Journal of Medicine* 2005;352(16):1685-1695.
3. Hansson GK, Libby P. The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nature Reviews Immunology* 2006;6(7):508-519.
4. Ross R. Mechanisms of disease - Atherosclerosis - An inflammatory disease. *New England Journal of Medicine* 1999;340(2):115-126.
5. Stephens JW, Khanolkar MP, Bain SC. The biological relevance and measurement of plasma markers of oxidative stress in diabetes and cardiovascular disease. *Atherosclerosis* 2009;202(2):321-329.
6. Higashi Y, Sasaki S, Nakagawa K, Matsuura H, Oshima T, Chayama K. Endothelial function and oxidative stress in renovascular hypertension. *New England Journal of Medicine* 2002;346(25):1954-1962.
7. Blankenberg S, Rupprecht HJ, Bickel C, Torzewski M, Hafner G, Tiret L, et al. Glutathione peroxidase 1 activity and cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *New England Journal of Medicine* 2003;349(17):1605-1613.
8. Yokoyama M. Oxidant stress and atherosclerosis. *Current Opinion in Pharmacology* 2004;4(2):110-115.
9. Meisinger C, Baumert J, Khuseynova N, Loewel H, Koenig W. Plasma oxidized low-density lipoprotein, a strong predictor for acute coronary heart disease events in apparently healthy, middle-aged men from the general population. *Circulation* 2005;112(5):651-657.
10. Frostegard J, Wu RH, Giscombe R, Holm G, Lefvert AK, Nilsson J. Induction of T-cell activation by oxidized low-density-lipoprotein. *Arteriosclerosis and Thrombosis* 1992;12(4):461-467.
11. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002;420(6917):868-874.
12. Virmani R, Burke AP, Farb A, Kolodgie FD. Pathology of the vulnerable plaque. *Journal of the American College of Cardiology* 2006;47(8):C13-C18.
13. Bui QT, Prempeh M, Wilensky RL. Atherosclerotic plaque development. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2009(41):2109-2113.
14. Maziere C, Maziere JC. Activation of transcription factors and gene expression by oxidized low-density lipoprotein. *Free Radical Biology and Medicine* 2009;46(2):127-137.
15. Robbesyn F, Garcia V, Auge N, Vieira O, Frisach MF, Salvayre R, et al. HDL counterbalance the proinflammatory effect of oxidized LDL by inhibiting intracellular reactive oxygen species rise, proteasome activation, and subsequent NF-kappa B activation in smooth muscle cells. *Faseb Journal* 2003;17(2):743-+.
16. Chen JW, Chen YH, Lin SJ. Long-term exposure to oxidized low-density lipoprotein enhances tumor necrosis factor-alpha-stimulated endothelial adhesiveness of monocytes by activating superoxide generation and redox-sensitive pathways. *Free Radical Biology and Medicine* 2006;40(5):817-826.
17. Witztum JL, Steinberg D. ROLE OF OXIDIZED LOW-DENSITY-LIPOPROTEIN IN ATHEROGENESIS. *Journal of Clinical Investigation* 1991;88(6):1785-1792.

18. Toshima S, Hasegawa A, Kurabayashi M, Itabe H, Takano T, Sugano J, et al. Circulating oxidized low density lipoprotein levels - A biochemical risk marker for coronary heart disease. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 2000;20(10):2243-2247.
19. Vanderwal AC, Becker AE, Vanderloos CM, Das PK. SITE OF INTIMAL RUPTURE OR EROSION OF THROMBOSED CORONARY ATHEROSCLEROTIC PLAQUES IS CHARACTERIZED BY AN INFLAMMATORY PROCESS IRRESPECTIVE OF THE DOMINANT PLAQUE MORPHOLOGY. *Circulation* 1994;89(1):36-44.
20. Suzuki T, Kohno H, Hasegawa A, Toshima S, Amaki T, Kurabayashi M, et al. Diagnostic implications of circulating oxidized low density lipoprotein levels as a biochemical risk marker of coronary artery disease. *Clinical Biochemistry* 2002;35(5):347-353.
21. Holvoet P, Vanhaecke J, Janssens S, Van de Werf F, Collen D. Oxidized LDL and malondialdehyde-modified LDL in patients with acute coronary syndromes and stable coronary artery disease. *Circulation* 1998;98(15):1487-1494.
22. Ehara S, Ueda M, Naruko T, Haze K, Itoh A, Otsuka M, et al. Elevated levels of oxidized low density lipoprotein show a positive relationship with the severity of acute coronary syndromes. *Circulation* 2001;103(15):1955-1960.
23. Nishi K, Itabe H, Uno M, Kitazato KT, Horiguchi H, Shinno K, et al. Oxidized LDL in carotid plaques and plasma associates with plaque instability. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 2002;22(10):1649-1654.
24. Mertens A, Holvoet P. Oxidized LDL and HDL: antagonists in atherothrombosis. *Faseb Journal* 2001;15(12):2073-2084.
25. Madamanchi NR, Vendrov A, Runge MS. Oxidative stress and vascular disease. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 2005;25(1):29-38.
26. Holvoet P, Mertens A, Verhamme P, Bogaerts K, Beyens G, Verhaeghe R, et al. Circulating oxidized LDL is a useful marker for identifying patients with coronary artery disease. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 2001;21(5):844-848.
27. Napoleão P. "Inflammation, Thrombosis and Endothelial Dysfunction in Myocardial Infarction". 2009.
28. Shimada K. Immune System and Atherosclerotic Disease - Heterogeneity of Leukocyte Subsets Participating in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *Circulation Journal* 2009;73(6):994-1001.
29. Arosa FA, Cardoso EM, Pacheco FC. Fundamentos de Imunologia: LIDEL; 2007.
30. Auffray C, Sieweke MH, Geissmann F. Blood Monocytes: Development, Heterogeneity, and Relationship with Dendritic Cells. *Annual Review of Immunology* 2009;27:669-692.
31. Still WJS, Oneal RM. ELECTRON MICROSCOPIC STUDY OF EXPERIMENTAL ATHEROSCLEROSIS IN RAT. *American Journal of Pathology* 1962;40(1):21-&.
32. Gerrity RG, Naito HK, Richardson M, Schwartz CJ. DIETARY INDUCED ATHEROGENESIS IN SWINE - MORPHOLOGY OF THE INTIMA IN PRE-LESION STAGES. *American Journal of Pathology* 1979;95(3):775-&.
33. Terkeltaub R, Banka CL, Solan J, Santoro D, Brand K, Curtiss LK. OXIDIZED LDL INDUCES MONOCYTIC CELL EXPRESSION OF INTERLEUKIN-8, A CHEMOKINE WITH T-LYMPHOCYTE CHEMOTACTIC ACTIVITY. *Arteriosclerosis and Thrombosis* 1994;14(1):47-53.
34. Jonasson L, Holm J, Skalli O, Bondjers G, Hansson GK. REGIONAL ACCUMULATIONS OF T-CELLS, MACROPHAGES, AND SMOOTH-MUSCLE CELLS IN THE HUMAN ATHEROSCLEROTIC PLAQUE. *Arteriosclerosis* 1986;6(2):131-138.
35. Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA, Kuby J. Immunology. Fifth edition ed: whfreeman.

36. Frostegard J, Ulfgren AK, Nyberg P, Hedin U, Swedenborg J, Andersson U, et al. Cytokine expression in advanced human atherosclerotic plaques: dominance of pro-inflammatory (Th1) and macrophage-stimulating cytokines. *Atherosclerosis* 1999;145(1):33-43.
37. Tedgui A, Mallat Z. Cytokines in atherosclerosis: Pathogenic and regulatory pathways. *Physiological Reviews* 2006;86(2):515-581.
38. Uwe S. Anti-inflammatory interventions of NF-kappa B signaling: Potential applications and risks. *Biochemical Pharmacology* 2008;75(8):1567-1579.
39. Tak PP, Firestein GS. NF-kappa B: a key role in inflammatory diseases. *Journal of Clinical Investigation* 2001;107(1):7-11.
40. Ahn KS, Sethi G, Aggarwal BB. Nuclear factor-kappa B: From clone to clinic. *Current Molecular Medicine* 2007;7(7):619-637.
41. Prigent M, Barlat I, Langen H, Dargemont C. I kappa B alpha and I kappa B alpha/NF-kappa B complexes are retained in the cytoplasm through interaction with a novel partner, RasGAP SH3-binding protein 2. *Journal of Biological Chemistry* 2000;275(46):36441-36449.
42. Barnes PJ, Larin M. Mechanisms of disease - Nuclear factor-kappa b - A pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *New England Journal of Medicine* 1997;336(15):1066-1071.
43. de Winther MPJ, Kanters E, Kraal G, Hofker MH. Nuclear factor kappa B signaling in atherogenesis. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 2005;25(5):904-914.
44. Valen G, Yan ZQ, Hansson GK. Nuclear factor kappa-B and the heart. *Journal of the American College of Cardiology* 2001;38(2):307-314.
45. Brand K, Page S, Rogler G, Bartsch A, Brandl R, Knuechel R, et al. Activated transcription factor nuclear factor-kappa B is present in the atherosclerotic lesion. *Journal of Clinical Investigation* 1996;97(7):1715-1722.
46. Ferreira V, van Dijk KW, Groen AK, Vos RM, van der Kaa J, Gijbels MJJ, et al. Macrophage-specific inhibition of NF-kappa B activation reduces foam-cell formation. *Atherosclerosis* 2007;192(2):283-290.
47. Wilson SH, Caplice NM, Simari RD, Holmes DR, Carlson PJ, Lerman A. Activated nuclear factor-kappa B is present in the coronary vasculature in experimental hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 2000;148(1):23-30.
48. Iiyama K, Hajra L, Iiyama M, Li HM, DiChiara M, Medoff BD, et al. Patterns of vascular cell adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 expression in rabbit and mouse atherosclerotic lesions and at sites predisposed to lesion formation. *Circulation Research* 1999;85(2):199-207.
49. Hajra L, Evans AI, Chen M, Hyduk SJ, Collins T, Cybulsky MI. The NF-kappa B signal transduction pathway in aortic endothelial cells is primed for activation in regions predisposed to atherosclerotic lesion formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2000;97(16):9052-9057.
50. Karin M, Lin A. NF-kappa B at the crossroads of life and death. *Nature Immunology* 2002;3(3):221-227.
51. Lawrence T, Gilroy DW, Colville-Nash PR, Willoughby DA. Possible new role for NF-kappa B in the resolution of inflammation. *Nature Medicine* 2001;7(12):1291-1297.
52. Wilson SH, Best PJM, Edwards WD, Holmes DR, Carlson PJ, Celermajer DS, et al. Nuclear factor-kappa B immunoreactivity is present in human coronary plaque and enhanced in patients with unstable angina pectoris. *Atherosclerosis* 2002;160(1):147-153.
53. Ritchie NE. Nuclear Factor-kappa B is selectively and markedly activated in humans with unstable angina pectoris. *Circulation* 1998;98(17):1707-1713.

54. Cominacini L, Anselmi M, Garbin U, Pasini AF, Stranieri C, Fusaro M, et al. Enhanced plasma levels of oxidized low-density lipoprotein increase circulating nuclear factor-kappa B activation in patients with unstable angina. *Journal of the American College of Cardiology* 2005;46(5):799-806.
55. Liuzzo G, Santamaria M, Biasucci LM, Narducci M, Colafrancesco V, Porto A, et al. Persistent activation of nuclear factor kappa-B signaling pathway in patients with unstable angina and elevated levels of C-reactive protein - Evidence for a direct proinflammatory effect of azide and lipopolysaccharide-free C-reactive protein on human monocytes via nuclear factor kappa-B activation. *Journal of the American College of Cardiology* 2007;49(2):185-194.
56. Frantz S, Stoerk S, Ok S, Wagner H, Angermann CE, Ertl G, et al. Effect of chronic heart failure on nuclear factor kappa B in peripheral leukocytes. *American Journal of Cardiology* 2004;94(5):671-673.
57. Siednienko J, Jankowska EA, Banasiak W, Gorczyca WA, Ponikowski P. Nuclear factor-kappaB activity in peripheral blood mononuclear cells in cachectic and non-cachectic patients with chronic heart failure. *International Journal of Cardiology* 2007;122(2):111-116.
58. Parhami F, Fang ZT, Fogelman AM, Andalibi A, Territo MC, Berliner JA. MINIMALLY MODIFIED LOW-DENSITY-LIPOPROTEIN INDUCED INFLAMMATORY RESPONSES IN ENDOTHELIAL-CELLS ARE MEDIATED BY CYCLIC ADENOSINE-MONOPHOSPHATE. *Journal of Clinical Investigation* 1993;92(1):471-478.
59. Brand K, Page S, Walli AK, Neumeier D, Baeuerle PA. Role of nuclear factor-kappa B in atherogenesis. *Experimental Physiology* 1997;82(2):297-304.
60. Jovinge S, Ares MPS, Kallin B, Nilsson J. Human monocytes/macrophages release TNF-alpha in response to Ox-LDL. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 1996;16(12):1573-1579.
61. Brand K, Eisele T, Kreusel U, Page M, Page S, Haas M, et al. Dysregulation of monocytic nuclear factor-kappa B by oxidized low-density lipoprotein. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 1997;17(10):1901-1909.
62. Ohlsson BG, Englund MCO, Karlsson ALK, Knutsen E, Erixon C, Skribeck H, et al. Oxidized low density lipoprotein inhibits lipopolysaccharide-induced binding of nuclear factor-kappa B to DNA and the subsequent expression of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta in macrophages. *Journal of Clinical Investigation* 1996;98(1):78-89.
63. Hourton D, Stengel D, Chapman MJ, Ninio E. Oxidized low density lipoproteins downregulate LPS-induced platelet-activating factor receptor expression in human monocyte-derived macrophages - Implications for LPS-induced nuclear factor-kappa B binding activity. *European Journal of Biochemistry* 2001;268(16):4489-4496.
64. Page S, Fischer C, Baumgartner B, Haas M, Kreusel U, Loidl G, et al. 4-hydroxynonenal prevents NF-kappa B activation and tumor necrosis factor expression by inhibiting I kappa B phosphorylation and subsequent proteolysis. *Journal of Biological Chemistry* 1999;274(17):11611-11618.
65. Muroya T, Ihara Y, Ikeda S, Yasuoka C, Miyahara Y, Urata Y, et al. Oxidative modulation of NF-kappa B signaling by oxidized low-density lipoprotein. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2003;309(4):900-905.
66. Manual Merck, Saúde para a família Merck Sharp & Dohme 2009; <http://www.manualmerck.net/> (acedido em 15 Outubro de 2010)
67. CEDARLANE® Laboratories Limited, Lympholyte®-H; <http://www.cedarlanelabs.com/DataSheets/CL5015.pdf> (acedido em 5 Outubro de 2010)
68. Rockland. [http://www.biomol.de/infos\\_rockland.html?id=160](http://www.biomol.de/infos_rockland.html?id=160) (acedido em 20 Novembro 2009)



69. Peterson GL. SIMPLIFICATION OF PROTEIN ASSAY METHOD OF LOWRY ET AL - WHICH IS MORE GENERALLY APPLICABLE. *Analytical Biochemistry* 1977;83(2):346-356.
70. Invitrogen™. NuPAGE® Novex Midi Gel System, 2006; [http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/novex\\_midigel\\_man.pdf](http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/novex_midigel_man.pdf) (acedido em 5 outubro de 2010)
71. Rockland, Immunochemicals, Inc. Chemiluminescent Western Blot Kit: FemtoMax™ Super sensitive Chemiluminescent Substrate Kit for Immunoblotting 2008; <http://www.rockland-inc.com/files/supplementalInfo/KCA003.pdf> (acedido em 5 Outubro 2010).
72. Millipore. SNAP i.d. Protein Detection System. 2008; [http://www.millipore.com/userguides.nsf/a73664f9f981af8c852569b9005b4eee/7a1fdc9636f2834b8525742c0008d5fe/\\$FILE/00103871.pdf](http://www.millipore.com/userguides.nsf/a73664f9f981af8c852569b9005b4eee/7a1fdc9636f2834b8525742c0008d5fe/$FILE/00103871.pdf) (acedido em 6 de Outubro de 2010)
73. Mercodia. Oxidized LDL ELISA; <http://www.mercodia.se/uploads/modules/Mercodia/manuals/DfU%20OxLDL%20100414.pdf> (acedido em 4 Outubro 2010)
74. Armstrong EJ, Morrow DA, Sabatine MS. Inflammatory biomarkers in acute coronary syndromes - Part II: Acute-phase reactants and biomarkers of endothelial cell activation. *Circulation* 2006;113(7):E152-E155.
75. Babuin L, Jaffe AS. Troponin: the biomarker of choice for the detection of cardiac injury. *Canadian Medical Association Journal* 2005;173(10):1191-1202.
76. Kemperman H, van den Berg M, Kirkels H, de Jonge N. B-type natriuretic peptide (BNP) and N-terminal proBNP in patients with end-stage heart failure supported by a left ventricular assist device. *Clinical Chemistry* 2004;50(9):1670-1672.
77. Libby P. Current concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndromes. *Circulation* 2001;104(3):365-372.
78. Syrjala H, Surcel HM, Ilonen J. LOW CD4/CD8 LYMPHOCYTE-T RATIO IN ACUTE MYOCARDIAL-INFARCTION. *Clinical and Experimental Immunology* 1991;83(2):326-328.
79. Pasqui AL, Di Renzo M, Bova G, Bruni F, Puccetti L, Pompella G, et al. T cell activation and enhanced apoptosis in non-ST elevation myocardial infarction. *Clinical and Experimental Medicine* 2003;3(1):37-44.
80. Mathes E, O'Dea EL, Hoffmann A, Ghosh G. NF-kappa B dictates the degradation pathway of I kappa B alpha. *Embo Journal* 2008;27(9):1357-1367.

## ANEXO I – SOLUÇÕES

---

### 1. Separação das fracções nucleares e citoplasmáticas

#### **Tampão para isolamento da fracção citoplasmática com NP-40 (Tampão C40)**

Preparou-se uma solução 1x com HEPES 10 mM, KCl 60 mM, EDTA 1 mM, NP40 a 0.075 % (v/v) e DTT 1 mM

#### **Tampão sem detergente para isolamento da fracção citoplasmática (Tampão C)**

Preparou-se uma solução semelhante ao tampão C40 mas sem o detergente NP-40.

#### **Tampão para isolamento da fracção nuclear (Tampão N)**

Preparou-se uma solução 1x com Tris HCl 20 mM, NaCl 420 mM, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, EDTA 0.2 mM e glicerol a 25 % (v/v)

### 2. Quantificação da proteína nos extractos celulares pelo método Lowry simplificado

#### **Reagente A - Reagente de Cobre e Tartarato**

CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.1 %	1 volume
Tartarato de sódio	0.2 %	1 volume
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	10 %	1 volume
SDS	5 %	2 volumes
NaOH	0.8 M	1 volume

#### **Solução mãe BSA**

Preparou-se uma solução mãe de BSA com 5 mg de BSA por litro.

#### **Solução BSA para Curva Padrão**

Diluir 50x a solução mãe de BSA para curva de calibração

#### **Folin (1:7)**

Preparou-se uma solução com diluição 1:7 a partir de Folin diluído a 1:5

### 3. Western Blotting

**Tampão de Corrida 1x**, para 1 litro:

- 50 ml de tampão de corrida NuPAGE® (MOPS) com SDS (20x)
- 1000 ml de água ultrapura

**Tampão de Transferência 2x com 10% de metanol**, para 500 ml

- 50 ml de tampão de transferência NuPAGE® (20x)
- 0,5ml de Antioxidante NuPAGE®
- 50 ml de metanol
- perfazer até 500ml com água ultrapura

**Tampão de Diluição dos anticorpos e para lavagens**\_ TPBS (Tampão fosfato salino com Tween-20), para 1 litro:

- PBS previamente preparado
- 1 ml de Tween-20

**Tampão de Bloqueio**\_ TPBS (Tampão fosfato salino com Tween-20) com 1% de BSA, para 100ml:

- 100 ml de TPBS
- 1,0 g de BSA

**Reagente de quimioluminescência FemtoMax™**

Adicionar 1 ml Reagente Luminol (Reagente A) a 1 ml Tampão de reação (Reagente B). Agitar vigorosamente.

NOTA: PREPARAR IMEDIATAMENTE ANTES DE UTILIZAR

### 4. Identificação das populações de leucócitos por citometria de fluxo

**Solução de Lise** (FACS Lysing Solution BD):

A solução de lise deve ser diluída a 1:10 em água destilada, sendo a solução obtida estável por 1 mês à temperatura ambiente (20 a 25 °C).

**PBS**

Pretendendo um volume final de 1 l de PBS, o qual terá cerca de 1 mês de validade se guardado entre à temperatura ambiente (20 a 25 °C):

$K_2HPO_4$  – 7,52 g

$Na_2HPO_4$  (2H<sub>2</sub>O) – 1,32 g

NaCl – 7,2 g

Agitar no agitador magnético.

**Paraformaldeído 1% em PBS**

Pretendendo um volume final de 5 ml de Paraformaldeído 1% em PBS, o qual terá cerca de 1 mês de validade se guardado à temperatura ambiente (20° a 25°C):

$$\begin{array}{rcl} 100 \text{ ml} & \text{---} & 1 \text{ g} \\ 5 \text{ ml} & \text{---} & x \end{array} \quad x = 0,05 \text{ g Paraformaldeído}$$

Perfazer com 5 ml de PBS em banho-maria a 70°C.

**5. Quantificação da ox-LDL por ELISA****Padrões para a curva de calibração**

Reconstituir o conteúdo de cada frasco com 1000 µl de água bidestilada. Após reconstituição estes reagentes têm 1 semana de validade quando armazenados a 2 – 8 °C.

**Controlos (Low), (High)**

Reconstituir o conteúdo de cada frasco com 1000 µl de água bidestilada. Após reconstituição estes reagentes têm 1 semana de validade quando armazenados a 2 – 8 °C.

**Tampão de lavagem**

Diluir 40 ml de tampão de lavagem em 800 ml de água bidestilada. Após diluição este tampão tem 1 mês de validade quando armazenado a 2 – 8 °C.

**Tampão de amostra:**

Diluir 50 ml de tampão de amostra em 150 ml de água bidestilada e agitar no vortex ou agitador para dissolver o precipitado. O código de cor deste tampão é amarelo. Após diluição este tampão tem 1 mês de validade quando armazenado a 2 – 8 °C.

**Conjugado enzimático**

Diluir 1200 µl de conjugado enzimático em 12 ml de tampão de conjugado enzimático. Após diluição este tampão tem 1 mês de validade quando armazenado a 2 – 8 °C.

## ANEXO II- MÉTODOS

---

### **1. Separação das células mononucleadas do sangue periférico (CMNs)**

A separação das CMNs foi efectuada por gradiente de densidade, num meio específico, Lympholyte®-H (CEDARLANE® Laboratories Limited).

**PROTOCOLO** (protocolo fornecido pelo fabricante)<sup>60</sup>:

**1.** Diluir 2 ou 3 ml de sangue total com EDTA em 2 ou 3 ml de PBS, respectivamente (1:1)

**2.** Adicionar 2 ml de Lympholyte®-H a um tubo de centrifuga limpo. Utilizando uma pipeta de Pasteur descartável, pipetar cuidadosamente 4 ml de sangue diluído sobre a camada de Lympholyte®-H.

**3.** Centrifugar a 800 *g* durante 20 minutos à temperatura ambiente (16 °C).

**4.** Após centrifugação, temos uma camada bem definida de linfócitos na interface. Com recurso a uma pipeta de Pasteur de vidro, remover cuidadosamente as células da interface e transferir para um microtubo limpo ("banda").

**5.** Diluir as células transferidas de modo a reduzir a densidade da solução adicionando 200 µl de PBS ou até perfazer o volume total do microtubo. Centrifuga-se a 800 *g* durante 10 minutos a 16 °C para sedimentar as células e posteriormente descarta-se o sobrenadante.

**6.** Lavar adicionando 400 µl de PBS. Centrifuga-se a 800 *g* durante 10 minutos a 4°C, descartando o sobrenadante após centrifugação. Repetir a lavagem (total duas lavagens) descartando o sobrenadante no final.

**7.** Adicionar 400 µl de PBS. Retirar 40 µl do microtubo, para um microtubo limpo e devidamente identificado ("CMNs totais"). Centrifugam-se os dois microtubos ("banda" e "CMNs totais") a 800 *g* durante 10 minutos a 4 °C. Após centrifugação descartam-se os sobrenadantes.

#### **Microtubo "banda"**

**8.** O sedimento resultante é utilizado para a separação de fracções nucleares e citoplasmáticas (protocolo descrito a seguir)

**Microtubo “CMNs totais”**

**9.** Ao microtubo “CMNs totais” adiciona-se 20 µl de Tampão C (ver protocolo Separação das fracções nucleares e citoplasmáticas).

**10.** Divide-se o conteúdo do microtubo em dois microtubos devidamente etiquetados e adiciona-se o mesmo volume de tampão de amostra NuPAGE® a um dos microtubos. O microtubo ao qual se junta tampão de amostra é colocado durante 10 minutos em banho seco a 70 °C. Armazenar as duas alíquotas de cada extracto a -20 °C.

**2. Separação das fracções nucleares e citoplasmáticas**

O protocolo utilizado foi adaptado de um protocolo online<sup>68</sup> em que são utilizados tampões específicos (ver Anexo I.1).

**PROTOCOLO:**

**Nota:** antes de começar a trabalhar juntar DTT aos tampões C e C40 (500 µl de tampão + 0,5 µl de DTT 1M) e ao tampão de amostra (50 µl de tampão de amostra + 5 µl de DTT 0,5 M) de acordo com o número de amostras.

**1.** Ressuspender o sedimento em 50 µl de Tampão C40 e incubar em gelo durante 3 minutos.

**2.** Centrifugar a 1000 *g* durante 4 minutos a 8 °C. Remover o extracto citoplasmático (sobrenadante) para um tubo limpo e guardar (até à ultima centrifugação).

**3.** Adicionar 50 µl de Tampão C aos núcleos (sedimento). Ressuspender gentilmente.

**4.** Centrifugar os núcleos a 1000 *g* durante 4 minutos a 8 °C, descartando o sobrenadante após centrifugação.

**5.** Adicionar 20 µl de Tampão N ao sedimento nuclear e ajustar a concentração de sal até 40 mM (adicionando 0,7 µl de NaCl a 5 M.) Agitar no vortex para ressuspender o sedimento.

**6.** Incubar o extracto em gelo durante 10 minutos. Agitar no vortex a mistura periodicamente para ressuspender o sedimento.

**7.** Centrifugar o citoplasma (obtido no ponto 2) e os núcleos numa velocidade elevada (16000 *g*) durante 10 minutos a 8 °C para sedimentar detritos e restos celulares.

**8.** Dividir cada um dos sobrenadantes que constituem o extracto citoplasmático e o

extracto nuclear em duas alíquotas devidamente etiquetadas.

(Nota: Volumes dependentes da amostra)

**9.** Adicionar tampão de amostra NuPAGE® aos microtubos com as maiores quantidades de extracto (citoplasmático e nuclear) na proporção de 1:1. Aquecer no banho seco a 70 °C durante 10 minutos.

**10.** Armazenar as duas alíquotas de cada extracto a -20°C.

### **3. Quantificação da proteína nos extractos celulares pelo método Lowry simplificado**

A quantificação de proteína foi efectuada a partir de uma curva de calibração estabelecida para uma gama de concentrações de interesse (de 10 µg a 50 µg). Utilizou-se BSA (Merck) como padrão.

#### **PROTOCOLO:**

##### **I - Curva padrão**

**1.** Preparar 6 tubos com :

	<b>Branco</b>	<b>P 10 mg</b>	<b>P 20 mg</b>	<b>P 30 mg</b>	<b>P 40 mg</b>	<b>P 50 mg</b>
BSA (0.1mg/L)	-	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
H2O destilada	1	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5
Reagente A	1	1	1	1	1	1
Volume total (ml)	2	2	2	2	2	2

**2.** Agitar e incubar 10 minutos à temperatura ambiente (~20°C)

**3.** Adicionar 0,5 ml de Reagente Folin e agitar imediatamente no vortex

**4.** Ler a absorbância ao fim de 60 minutos a 750 nm.

**5.** Calcular a mediana para cada ponto. Representar graficamente a curva - concentração em abcissa e absorbância (A 750) em ordenada. Calcular a recta de regressão e os parâmetros da recta intercepção e declive.

##### **II - Determinação da proteína nas Amostras**

**6.** Diluir os extractos 1:20 (v/v) em tampão (PBS)

**7.** Adicionar por amostra:

	Branco	Amostra (A1)
Extracto 1/40		0.1
Tampão	0.1	
H <sub>2</sub> O destilada	0.9	0.9
Reagente A	1	1
Volume total (ml)	2	2

8. Agitar e incubar 10 minutos à temperatura ambiente (~20°C)
9. Adicionar 0,5 ml de Reagente Folin e agitar imediatamente no vortex
10. Ler a 750 nm ao fim de 60 minutos. Deverão ser efectuadas 3 leituras por amostra (de preferência preparar 3 tubos por amostra)

**11. Cálculos:**

Descontar o valor de A 750 do branco no valor obtido para a amostra

A quantidade de proteína na amostra é calculada a partir da equação da recta:

$$\text{Proteína (mg)} = [A_{750} (\text{amostra}) - I] / S$$

Onde:

I = valor de intercepção na origem

S = declive da recta

A quantidade de proteína no extracto em mg/ml tem de ter em conta a diluição da amostra (1:20) e o volume utilizado (0.1 ml):

$$\text{Factor de diluição} = 20 * 10 = 200$$

#### 4. Western Blotting

O sistema utilizado para a análise electroforética das proteínas dos extractos celulares foi o NuPAGE® Novex Midi Gel System (Invitrogen™), adaptando o protocolo fornecido pelo fabricante<sup>62</sup>. Todos os reagentes e tampões utilizados são próprios para o sistema NuPAGE® (Anexo I.3).

#### PROTOCOLO:

- ELECTROFORESE

##### Aquecimento:

Aquecer as amostras a 70 °C para a electroforese desnaturante durante 10 minutos.

1. Remover a cassette com o gel do invólucro de plástico e passar por água desionizada.
2. Retirar a película que tapa a slot nas costa da cassette de gel.
3. Montar o XCell4 Sure Lock™, colocar a cassette de gel e colocar na posição *locked*.



**4.** Encher o compartimento interior do tanque limitado pela cassette com o gel, com tampão de corrida 1x. Verificar se não há fugas e colocar então tampão de corrida no compartimento exterior do tanque.

**5.** Retirar o pente do gel e lavar os poços.

**6.** Colocar o antioxidante (435 µl).

**7.** Carregar um volume apropriado de amostra nos diferentes poços do gel.

**8.** Carregar o marcador de massa molecular (10 µl).

NOTA:

Marcador molecular:

- Descongelar à temperatura ambiente; *Vortex* até ter uma solução homogénea

**9.** Colocar a tampa do XCell4 *Sure Lock*™ Midi-cell. A tampa irá assentar correctamente se o eléctrodos + e – estiverem alinhados.

**10.** Correr a 200V durante 55 minutos.

Corrente esperada:

Início: 160-200 mA

Fim: 120-170 mA

Após corrida:

**1.** Após electroforese, desligar a fonte de alimentação, retirar os eléctrodos e remover o/os géis.

**2.** Separar o gel da cassette com a faca apropriada. Ter cuidado para não danificar o gel.

- TRANSFERÊNCIA

Equilibrar o gel:

**1.** Equilibrar o gel em 100 ml de tampão de transferência 2x durante 20 minutos num agitador orbital.

Preparação da membrana de blotting:

**1.** Utilizar membrana (PVDF) pré cortada ou cortar a membrana no tamanho apropriado

**2.** Ensopar a membrana em metanol por alguns minutos no tabuleiro de incubação

Protocolo de blotting semi-dry

**1.** Num recipiente limpo ou no tabuleiro de incubação, ensopar os 2 peças de papel de filtro e 2 peças de esponja, em tampão de transferência 2x.

**2.** Colocar uma esponja pré ensopada na placa do cátodo (-) do aparelho. Remover quaisquer bolhas a esponja e a placa.

**3.** Colocar um bocado de papel de filtro ensopado em tampão.

**4.** Colocar o gel por cima do papel de filtro e remover as bolhas de ar.

**5.** Colocar a membrana pré ensopada em cima do gel e remover quaisquer bolhas de ar.

**6.** Colocar a segunda peça de papel de filtro. Assegurar que está alinhado. Remover as bolhas de ar.

**7.** Colocar a segunda esponja. Remover as bolhas de ar.

**8.** Por fim colocar a placa do ânodo (+) com cuidado para não causar distúrbios na *sandwich* de *blotting*. Montar o aparelho de *blotting semi-dry*.

**9.** Transferir a 20V durante 2 hora (~33V/cm).

- IMUNODETECÇÃO

**1.** Prepararam-se os reagentes de acordo com o protocolo fornecido com o *FemtoMax™ Super sensitive Chemiluminescent Substrat Kit for Immunoblotting* (ver Anexo I.3).

Utilizou-se o equipamento SNAP i.d (Millipore™) para os procedimentos destinados à imunodeteccção.

**2.** Abrir o *blot holder* com cuidado e molhar a face branca do *blot holder* até ficar cinzenta.

**3.** Colocar a membrana pré-molhada no centro do *blot holder*, com o lado da proteína para baixo. Passar com o rolo para retirar o excesso de líquido e as bolhas de ar.

**4.** Colocar o *spacer*, tendo o cuidado de cobrir a membrana e retirar bolhas de ar com o rolo. Fechar o *blot holder* e colocar no sistema.

**5.** Adicionar um volume apropriado (ver tabela 3) de solução de bloqueio (TPBS com 1% de BSA) e incubar durante 10 minutos. Após incubação ligar a bomba de vácuo e abrir os botões de controlo do SNAP i.d. (10 a 20 segundos) de modo a retirar o tampão de bloqueio do *blot holder*.

**6.** Adicionar um volume apropriado de anticorpo primário (ver tabela 3) e incubar durante 10 minutos. Após incubação ligar a bomba de vácuo e abrir os botões de controlo do SNAP i.d. (10 a 20 segundos) de modo a retirar o anticorpo do *blot holder*.

**7.** Com a bomba de vácuo e os botões de controlo abertos continuamente, lavar o *blot* com um volume apropriado de tampão de lavagem (TPBS). Fazer um total de três lavagens.

**8.** Adicionar um volume apropriado de anticorpo secundário (ver tabela 3) e incubar durante 10 minutos. Após incubação ligar a bomba de vácuo e abrir os botões de controlo do SNAP i.d. (10 a 20 segundos) de modo a retirar o anticorpo do *blot holder*.

**9.** Repetir o passo 7.

**10.** Retirar o *blot holder* do sistema. Colocar em cima da bancada e retirar a membrana com cuidado com ajuda de uma pinça. Descartar o *blot holder*.

**Tabela 3.** Volumes para cada um dos *blot holders*

	<i>Blot holder</i>		
	um poço	dois poços	três poços
Solução de Bloqueio	30 ml /poço	15 ml/poço	10 ml/poço
Anticorpo	3 ml /poço	1,5 ml/poço	1 ml/ poço
Tampão de Lavagem	30 ml/poço	15 ml /poço	10 ml/poço

**NOTA:**

Utilizou-se uma diluição de 1:200 no caso do anticorpo primário específico para a subunidade p65 do NF- $\kappa$ B e uma diluição 1:100 no caso do anticorpo primário específico para a  $\alpha$ -tubulina. Para o anticorpo secundário utilizou-se um diluição de 1:8 000.

- REVELAÇÃO

**1.** Colocar dentro de uma cassete de exposição fotográfica, 1 pouco de papel 3MM com uma mica por cima. Colar duas réguas fluorescentes, uma de cada lado, tendo em conta o tamanho da membrana. Colocar uma outra mica por cima mas aberta de um dos lados, para depois colocar a membrana lá dentro.

**2.** Colocar a membrana após ter sido imersa no reagente quimioluminescente. Antes de colocar o filme apagar as luzes. Colocar o filme por cima da membrana, fechar a cassete e expor o filme durante 1 minuto ou mais (intervalo 60 segundos a 2 minutos).

**3.** Sempre às escuras retirar o filme da cassete e colocar 1 minuto no revelador. Passar por água (lavar) e colocar no fixador tempo suficiente (5 minutos). Lavar bem em água corrente e secar ao ar.

## **5. Identificação das populações de leucócitos por citometria de fluxo**

Os leucócitos foram identificados e caracterizados por citometria de fluxo através de um conjunto de anticorpos monoclonais conjugados com diferentes fluorocromos (APC, FITC, PE e PercP) (BD Biosciences, USA).

**PROTOCOLO:**

**1.** Pipetar para cada tubo 100  $\mu$ l de amostra (sangue total com EDTA) e 10  $\mu$ l ou 5  $\mu$ l de cada anticorpo segundo o esquema:

<b>Tubo</b>	<b>Acrónimo</b>	<b>PerCP</b>	<b>FITC</b>	<b>PE</b>	<b>APC</b>
Auto-Fluorescência	L-AF	-	-	-	-
Linfócitos	L-CD4CD8	CD45, 5µl	CD3, 5µl	CD8, 10 µl	CD4, 10 µl
Linfócitos activados	L-Act	CD45, 5µl	CD3, 5µl	CD49, 10 µl	CD69, 10µl
Monócitos	L-monoc	-	-	CD11b, 10µl	-

**2.** Misturar o conteúdo de cada tubo por agitação suave no *vortex* (durante 3 segundos) e incubar à temperatura ambiente, no escuro, durante 25 minutos.

**3.** Adicionar a cada tubo 2 ml de Solução de Lise 1x (previamente preparado).

**4.** Misturar o conteúdo de cada tubo por agitação suave no *vortex* (durante 3 segundos) e incubar à temperatura ambiente, no escuro, durante 10 minutos.

**5.** Centrifugar a 1500 rpm (500 g) durante 5 minutos. Remover o sobrenadante por decantação.

**6.** Adicionar a cada tubo 2,5 ml de PBS (previamente preparado) misturando o conteúdo do tubo por agitação suave no *vortex* (durante 3 segundos).

**7.** Centrifugar a 1500 rpm (500 g) durante 5 minutos. Remover o sobrenadante por decantação.

**8.** Adicionar a cada tubo 500 µl de PBS com paraformaldeído a 1% (previamente preparado) para fixação.

**9.** Misturar o conteúdo de cada tubo por agitação suave no *vortex*, durante 5 segundos.

**10.** Manter protegido da luz a 2-8 °C até análise, por um período máximo de 24h.

**11.** Analisar no citómetro de fluxo seguindo o protocolo correspondente.

## **6. Quantificação das Ox-LDL por ELISA**

Para quantificar as ox-LDL no plasma, utilizou-se a técnica ELISA e o Kit comercial da Mercodia (Uppsala, Suécia).

**PROTOCOLO** (protocolo fornecido pelo fabricante<sup>64</sup>):

**1.** Diluir 25 µl de plasma com EDTA em 2 ml de tampão de amostra. Agitar por inversão três vezes e posteriormente agitar no *vortex* para garantir uma mistura eficaz.

**2.** Diluir 25 µl de plasma com EDTA diluído em 2 ml de tampão de amostra. Agitar por inversão três vezes e posteriormente agitar no vortex para garantir uma mistura eficaz.

**3.** Adicionar 25 µl de cada calibrador, controle ou amostras diluídas, em duplicado.

**4.** Adicionar 100 µl de tampão de ensaio a cada poço.

**5.** Cobrir a placa com a cobertura fornecida pelo kit e incubar no agitador horizontal, à temperatura ambiente durante 2 horas.

**6.** Aspirar ou decantar cada poço. Lavar os poços enchendo-os com 350 µl de tampão de lavagem, usando uma pipeta multi-canal ou um auto-dispensador. Este procedimento deve ser repetido cinco vezes num total de 6 lavagens, tendo em atenção que a completa remoção do líquido após cada lavagem é essencial para garantir um bom ensaio. Após a última lavagem, deve-se remover qualquer resto de tampão de lavagem por aspiração ou decantação e inverter a placa sobre toalhas de papel.

**7.** Adicionar 100 µl de conjugado enzimático a cada poço. Cobrir a placa e incubar, no agitador horizontal, à temperatura ambiente durante 1 hora.

**8.** Repetir o processo de lavagem do passo 4.

**9.** Adicionar 200 µl de substrato TMB a cada poço. Cobrir a placa com nova cobertura e incubar à temperatura ambiente durante 15 minutos, sem agitação.

Esta solução deve permanecer sem coloração até ser adicionada na placa. A incubação desta solução em poços positivos provocará a sua mudança para diferentes gradações de azul.

**10.** Adicionar 50 µl de solução stop a cada poço. Esta solução deve ser adicionada aos poços pela mesma ordem que o substrato.

Após adicionar-se a solução stop a coloração dos poços deverá passar de azul a amarela.

**11.** Cobrir a placa e agitar, no agitador horizontal, à temperatura ambiente durante 15 segundos.

**12.** Determinar a densidade óptica de cada poço, medindo a absorbância num espectrofotómetro multi-canal a  $\lambda = 450$  nm. A medição deve ser realizada num intervalo de 30 minutos.

### Cálculos

**13.** Calcular a média das absorvências para cada padrão, amostra ou controlo e subtrair a média do P0.

**14.** Calcular a Curva de Calibração:

Logaritmizar as absorvências médias dos calibradores;

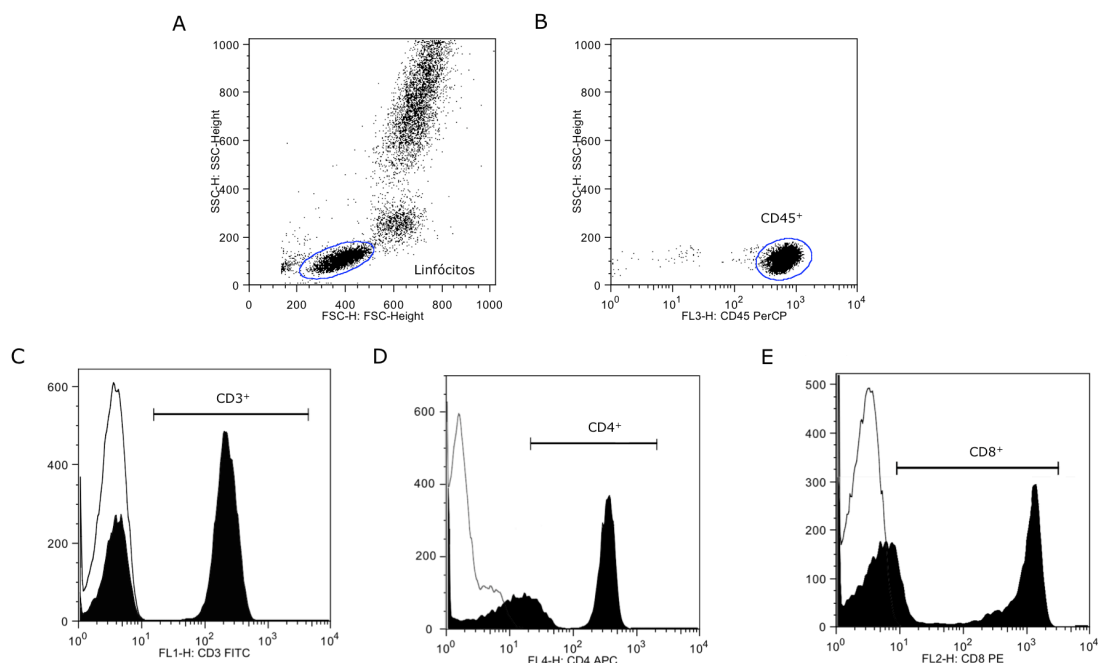
Construir a curva de calibração colocando a absorvência média dos calibradores no eixo dos yy contra a concentração de ox-LDL no eixo dos xx;

Traçar recta de calibração que melhor se ajustar ao gráfico no EXCEL;

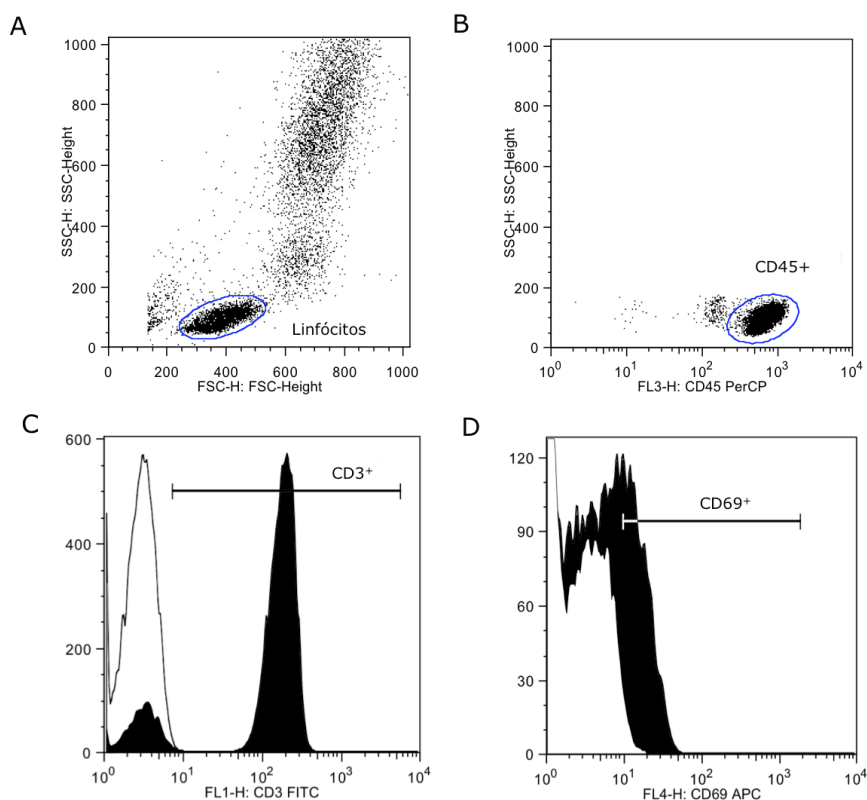
**15.** Calcular as concentrações de ox-LDL para cada Amostra a partir da curva de calibração, multiplicando pelo factor de diluição (6561):

$$[\text{ox-LDL}] = \{((\text{Abs. 450 nm}) - (\text{intercepção eixo yy})) / \text{declive da recta}\} * 6561$$

## ANEXO III- GRÁFICOS E TABELAS SUPLEMENTARES

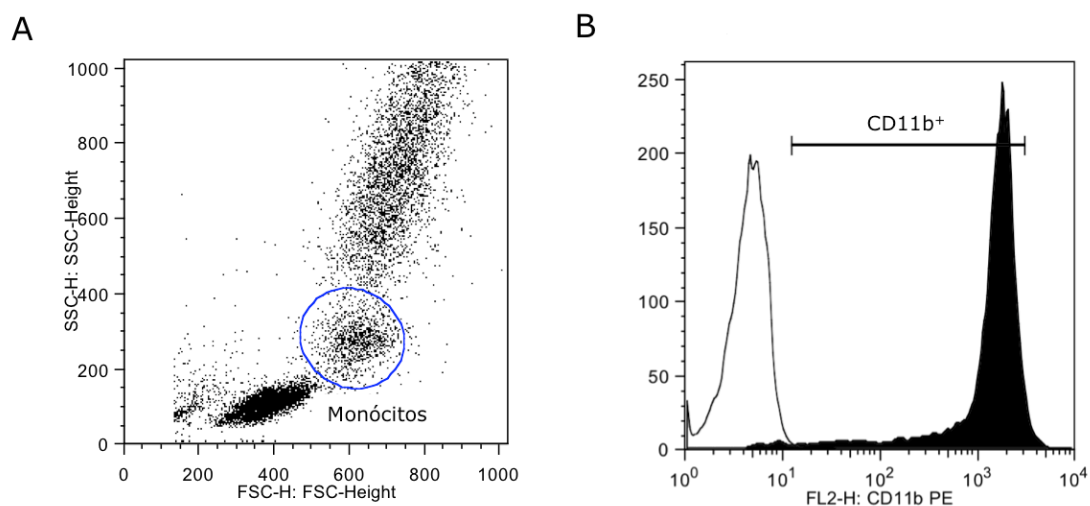


**Figura 1-** Representação gráfica da identificação da população de linfócitos e respectivas sub-populações; (A) *Dot Plot* definido em Side Scatter (SSC), *Forward scatter* (FSC) representativo da população de linfócitos; (B) *Dot Plot* representativo do gate da população de linfócitos CD45<sup>+</sup>, definida dentro da população de linfócitos; (C) Histograma de fluorescência representativo da expressão dos linfócitos CD3<sup>+</sup>, histograma sombreado a preto corresponde aos linfócitos positivos para CD3<sup>+</sup> e histograma sem sombreado corresponde à autofluorescência; (D) Histograma de fluorescência representativo da expressão dos linfócitos CD4<sup>+</sup>, histograma sombreado a preto corresponde aos linfócitos positivos para CD4<sup>+</sup> e histograma sem sombreado corresponde a autofluorescência ; (E) Histograma de fluorescência representativo da expressão dos linfócitos CD8<sup>+</sup>, histograma sombreado a preto corresponde aos linfócitos positivos para CD8<sup>+</sup> e histograma sem sombreado corresponde à autofluorescência;



**Figura 2-** Representação gráfica da identificação da população de linfócitos e respectivas sub-populações; (A) Dot Plot definido em *Side Scatter* (SSC), *Forward Scatter* (FSC) representativo da população de linfócitos; (B) Dot Plot representativo do gate da população de linfócitos CD45<sup>+</sup>, definida dentro da população de linfócitos; (C) Histograma de fluorescência representativo da expressão dos linfócitos CD3<sup>+</sup>, histograma sombreado a preto corresponde aos linfócitos positivos para CD3<sup>+</sup> e histograma sem sombreado corresponde à autofluorescência; (D) Histograma de fluorescência representativo da expressão dos linfócitos CD69<sup>+</sup>, histograma sombreado a preto corresponde aos linfócitos positivos para CD69a<sup>+</sup> e histograma sem sombreado corresponde à autofluorescência;





**Figura 3-** Representação gráfica da identificação da população de monócitos e respectivas populações; (A) *Dot Plot* definido em *Side Scatter* (SSC), *Forward scatter* (FSC) representativo da população de monócitos ; (B) Histograma de fluorescência representativo da expressão dos monócitos CD11b<sup>+</sup>, histograma sombreado a preto corresponde aos monócitos positivos para CD11b<sup>+</sup> e histograma sem sombreado corresponde à autofluorescência.